

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 28 June 2001 (28.06.01)	
International application No. PCT/JP00/04843	Applicant's or agent's file reference YK0019
International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 21 July 1999 (21.07.99)
Applicant SAWADA, Haruji et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

08 December 2000 (08.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Shinji IGARASHI

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 3-30667, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 08 February, 1991 (08.02.91), Full text; Claims (Family: none)	1-3, 8-10 4-7, 11-14
X Y	JP, 8-298982, A (Aasu Giken K.K.), 19 November, 1996 (19.11.96), Claim 1; Par. No. [0001] (Family: none)	1, 3, 8, 10 2, 4-7, 9, 11-14
Y	EP, 462021, A (CHIBA FLOUR MILLING CO. LTD.), 18 December, 1991 (18.12.91) & JP, 4-49243, A	1-14
Y	JP, 50-68867, A (Oriental Koubo Kogyo K.K.), 09 June, 1975 (09.06.75) (Family: none)	1-14
Y	Kazutomo IMAHORI et al. ed., "Seikagaku Jiten", Kabushiki Kaisha Tokyo Kagaku Doujin (1 st printing in 1984) p.763, "biosynthesis of bile acid" <u>Doc</u>	Will read soon later
A	US, 4891220, A (Immudyne, Inc.), 02 January, 1990 (02.01.90)	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 October, 2000 (06.10.00)Date of mailing of the international search report
17 October, 2000 (17.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04843

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15-19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15 to 19 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



1
2
3

Wächtershäuser, Günter, Prof. Dr.
Wächtershäuser & Hartz,
Patentanwälte,
Tal 29
80331 München
ALLEMAGNE

January 17, 02

Datum/Date
17. 12. 02

Zeichen/Ref./Réf. EA-PCT-11714	Anmeldung Nr./Application No./Demande n° // Patent Nr./Patent No./Brevet n° 00946404.1-2107/JP0004843
Anmelder/Applicant/Demandeur//Patentinhaber/Proprietor/Titulaire Kabushiki Kaisha Yakult Honsha	

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits the **supplementary** partial European search report under Rule 46(1) EPC relating to the above-mentioned European patent application.

Copies of the documents cited in the search report are enclosed.

The applicant's attention is drawn to the following:

The search Division informs the applicant that if the European search report is also to cover inventions other than the invention first mentioned in the claims, a further search fee must be paid for each of these inventions, within ONE MONTH after notification of this communication.

If the application has been filed up to 30 June 1999, the search fee in force before 01 July 1999 (EUR 869,--) or the equivalent applicable on the date of payment is payable.

This applies also to the search fees requested under Rule 46(1) EPC.

See also OJ EPO 06/1999, 405.

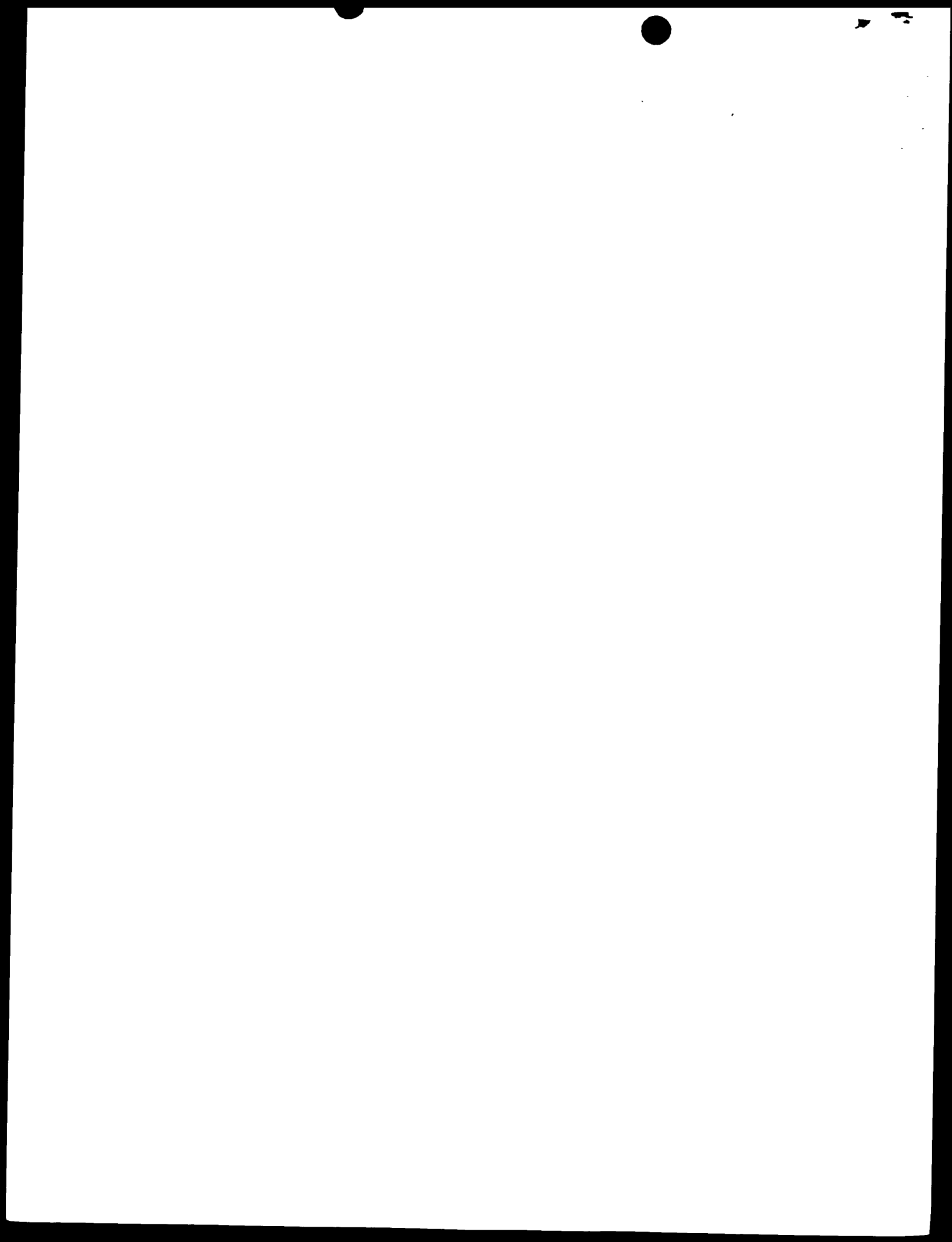
☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the supplementary European search report is (are) enclosed as well.



Note to users of the automatic debiting procedure:

Unless the EPO receives prior instructions to the contrary, the search fee(s) will be debited on the last day of the period for payment. For further details see the Arrangements for the automatic debiting procedure, Supplement to OJ EPO 02/1999.

REGISTERED LETTER





European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT**

under Rule 46, paragraph 1 of the European Patent Convention

Application Number

EP 00 94 6404

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	US 4 251 519 A (ROBBINS ERNEST A ET AL) 17 February 1981 (1981-02-17) *cf. abstract, col. 3, line 59 bridging with col. 4, lines 1-16, example 7 on col. 7* ---	1-3. 8-10, 15. 16	A61K35/72 A61P3/06 A23L1/28 A23L1/30
X →	JP 03 030667 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 8 February 1991 (1991-02-08) *cf. Patent Abstracts of Japan with PN 03030667* -----	1-3. 8-10, 15. 16	

TECHNICAL FIELDS
SEARCHED (Int.Cl.7)

A61K
A23L

LACK OF UNITY OF INVENTION

The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

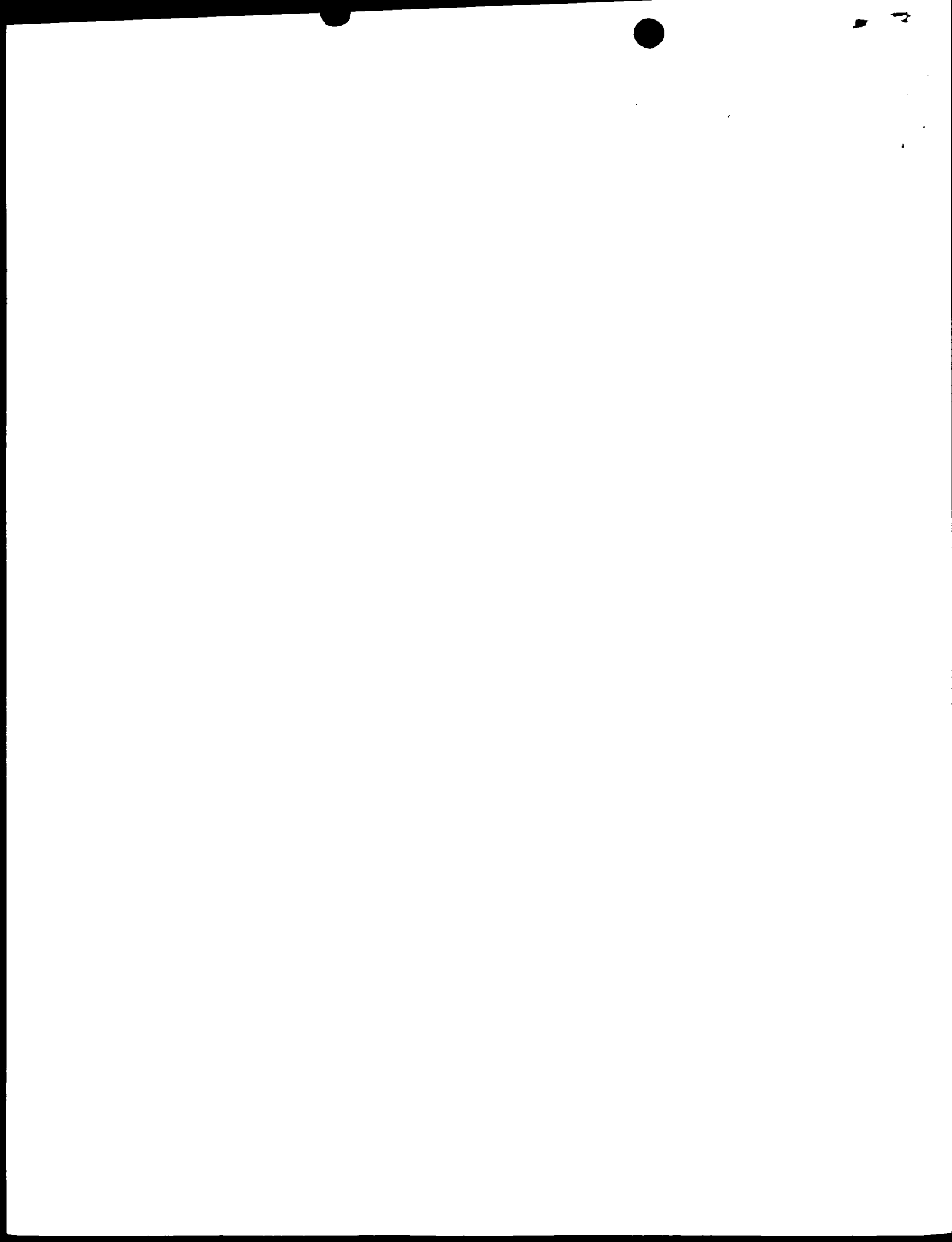
see sheet B

The present partial European search report has been drawn up for those parts of the European patent application which relate to the invention first mentioned in the claims.

1

EPC FORM 1503 03 82 (P04C23)

Place of search MUNICH	Date of completion of the search 26 November 2002	Examiner Stoltner, A
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document		



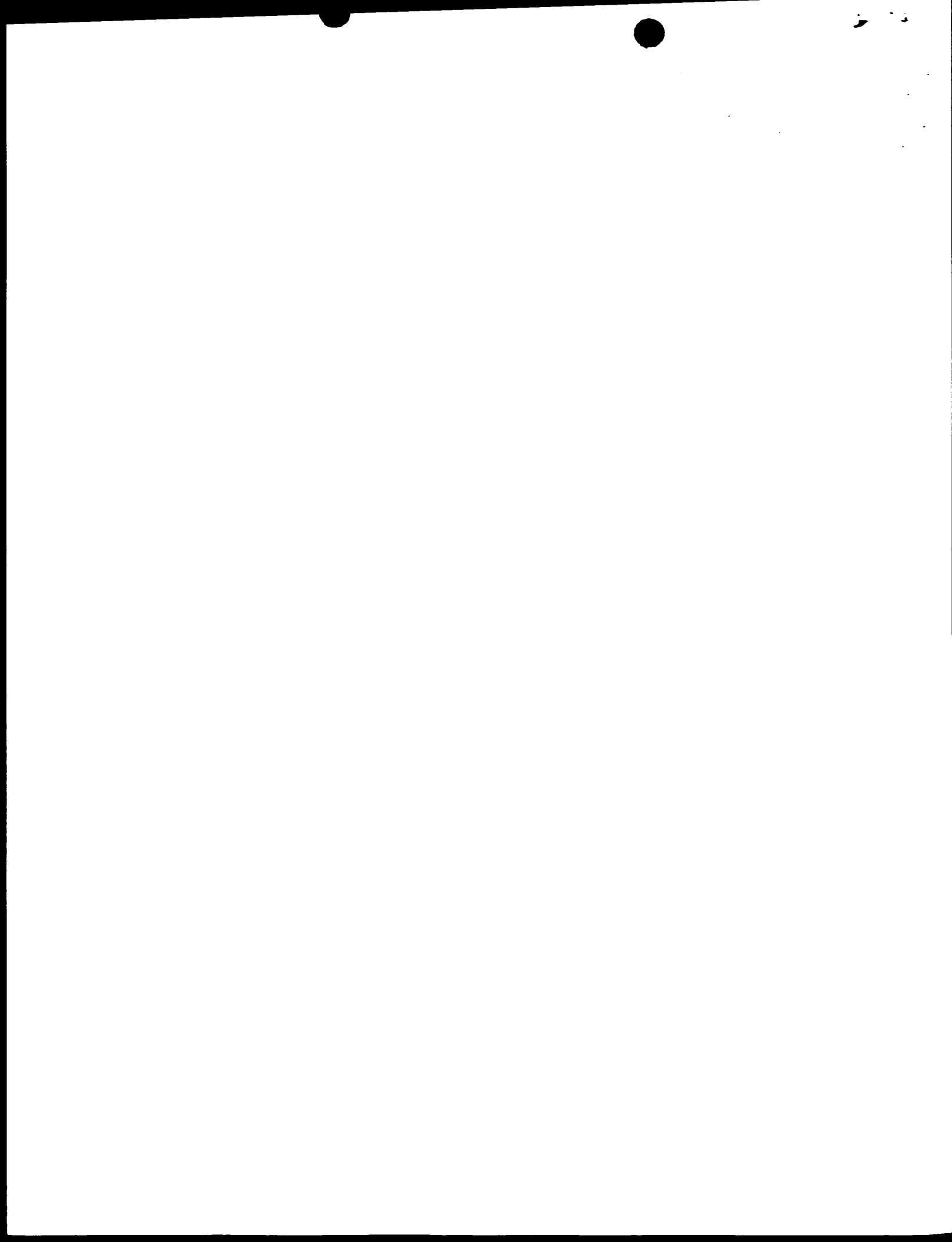
ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.

EP 00 94 6404

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

26-11-2002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4251519	A	17-02-1981	NONE	
JP 03030667	A	08-02-1991	NONE	





The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

1. Claims: 1-3, 8-10, 15-16

A cholesterol-lowering agent containing at least one yeast as an active ingredient, as well as the manufacture of a food or drink containing such cholesterol-lowering agent(s)

2. Claims: 4-7, 11-14, 17-19

A secondary bile acid production inhibitor containing a yeast as an active ingredient, use of said yeast for the manufacture of a secondary bile acid production inhibitor

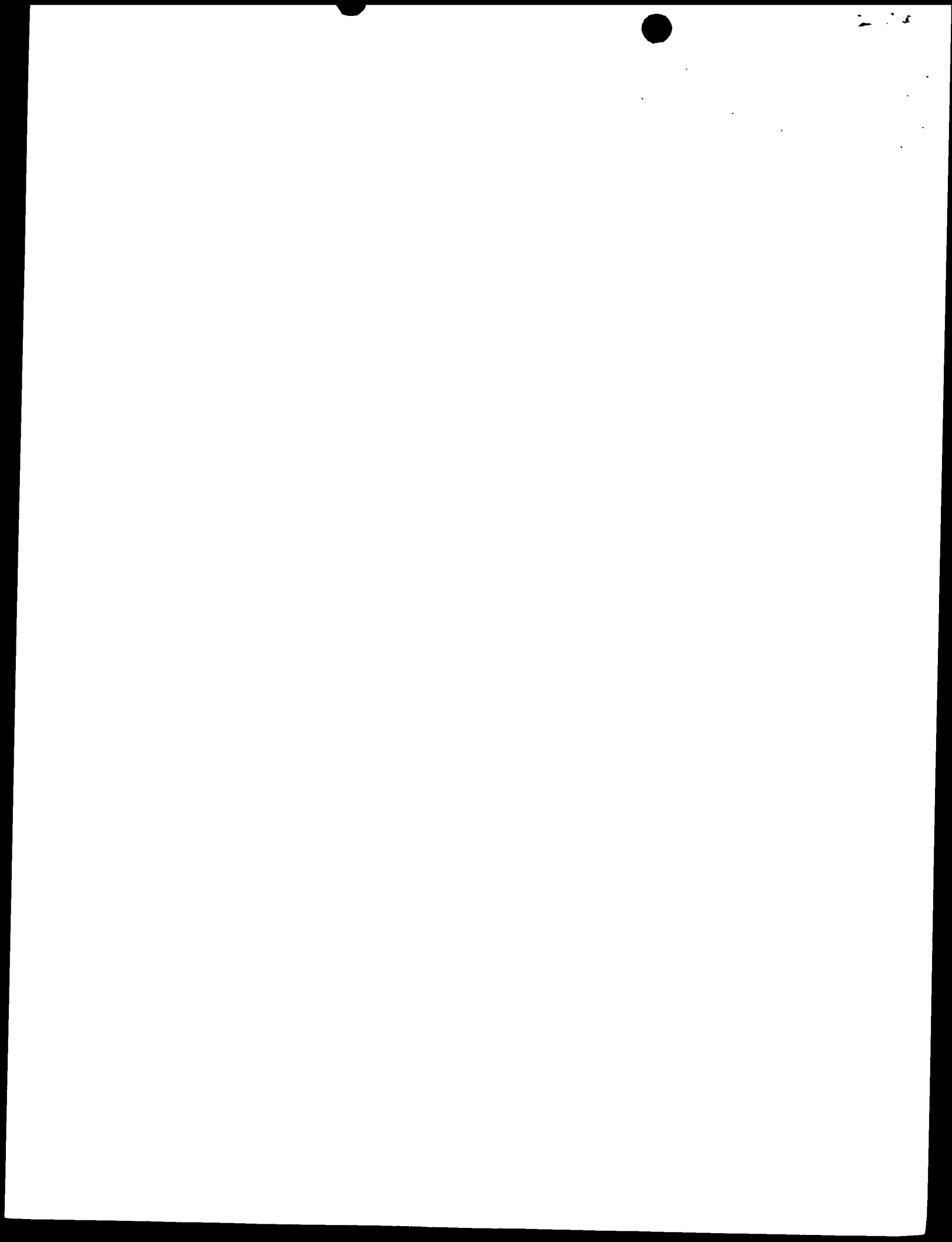
The present application relates to cholesterol-lowering agent capable of lowering the blood/hepatic cholesterol level, containing as an active ingredient at least one yeast belonging to *Candida*, *Issatchenkia*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia* or *Torulospora*. The present application furthermore concerns the use of a yeast as a secondary bile acid production inhibitor in the treatment of colorectal and liver cancer, pancreatic cancer or bile duct cancer or cholelithiasis.

The use of *Candida* keyfr (FERM P-10731) and *Candida tenuis* producing an acidic polysaccharide having cholesterol adsorbing capacity is known from JP-A-03030667 (Snow Brand Milk Products Co. Ltd.). Moreover, US-A-4 251 519, discloses the use of yeast glycan (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*) for preventing the increase of cholesterol and triglycerides in the blood of humans/animals.

As the use of cholesterol-lowering agents containing as active ingredient a yeast according to the present application is known in the prior art, the subjects as defined above are no longer linked by a common inventive concept involving a special technical/physiological feature in the sense of Art. 30 EPC.

Therefore the application lacks unity *à posteriori*.

As searching the other invention(s) would have caused a major additional searching effort, only the first invention was searched.





P B 5818 - Patentaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

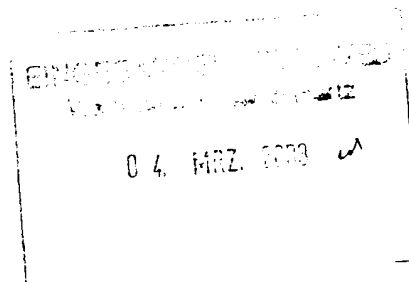
European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Wächtershäuser, Günter, Prof. Dr.
Wächtershäuser & Hartz,
Patentanwälte,
Tal 29
80331 München
ALLEMAGNE



Datum/Date

03.03.03

Zeichen/Ref./Réf. EA-PCT-11714	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent No./Brevet n°. 00946404.1
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire Kabushiki Kaisha Yakult Honsha	

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits

- ☐ the European search report
- ☐ the declaration under Rule 45 EPC
- ☐ the partial European search report under Rule 45 EPC
- ☒ the supplementary European search report concerning the international application under Article 157(2) EPC relating to the above-mentioned European patent application. Copies of the documents cited in the search report are enclosed.

The following specifications given by the applicant have been approved by the Search Division :

- ☐ Abstract
 - ☐ Title
 - ☐ Figure
 - ☐ The abstract was modified by the Search Division and the definitive text is attached to this communication.
 - ☐ The following figure will be published with the abstract, since the Search Division considers that it better characterises the invention than the one indicated by the applicant.
- Figure:
- ☒ Additional copy(copies) of the documents cited in the European search report.

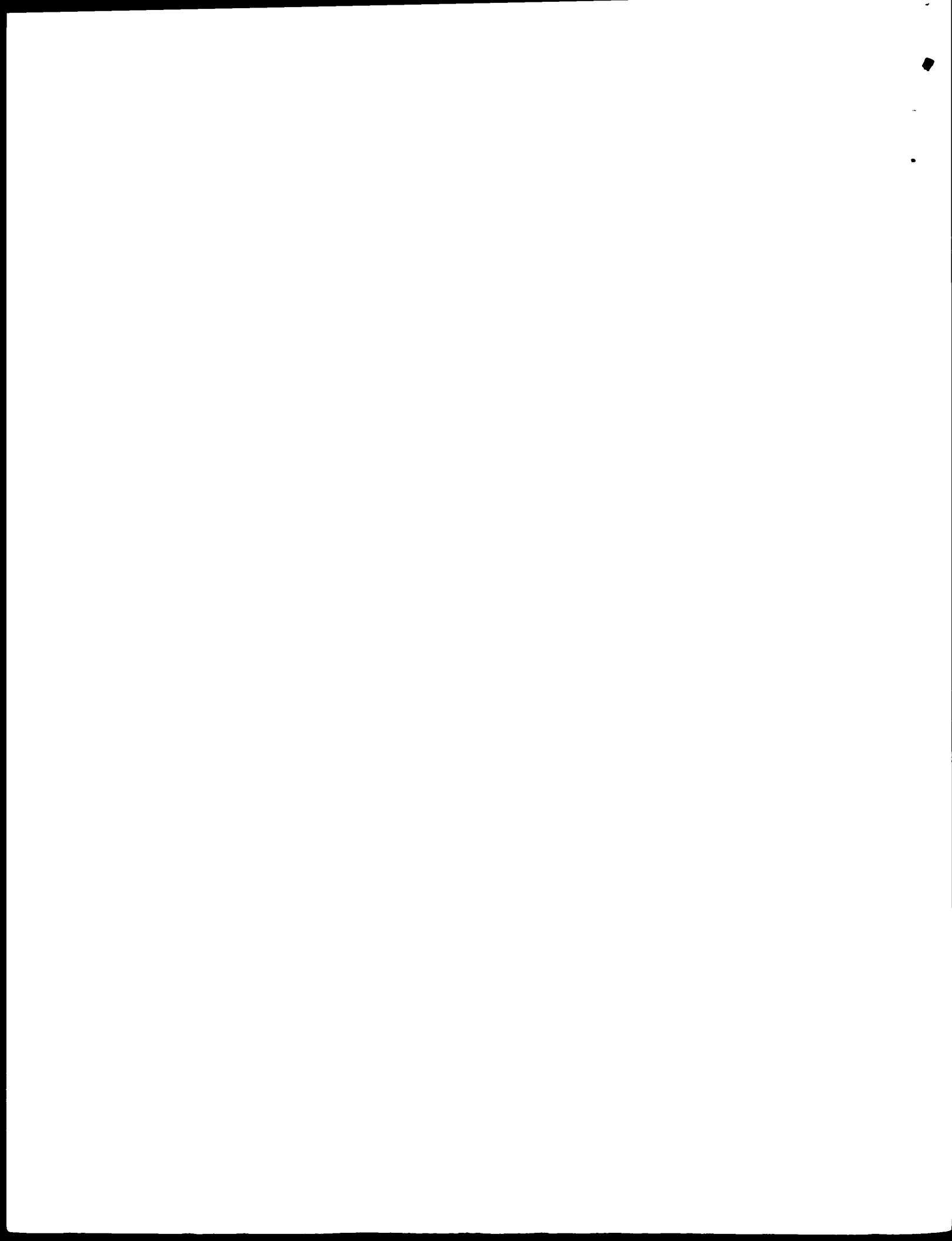
01

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.



EPO Form 1507 02.93





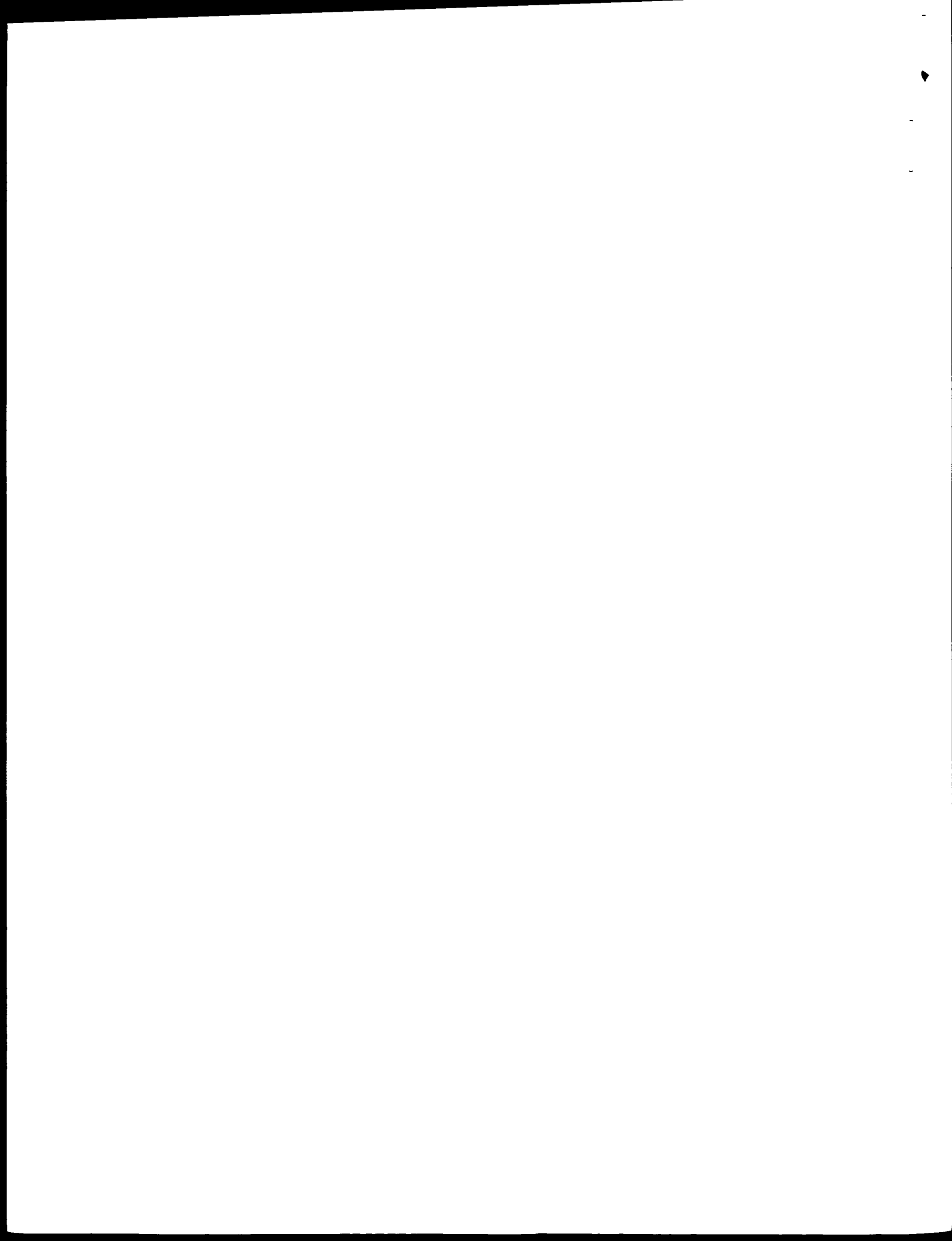
European Patent
Office

SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 00 94 6404

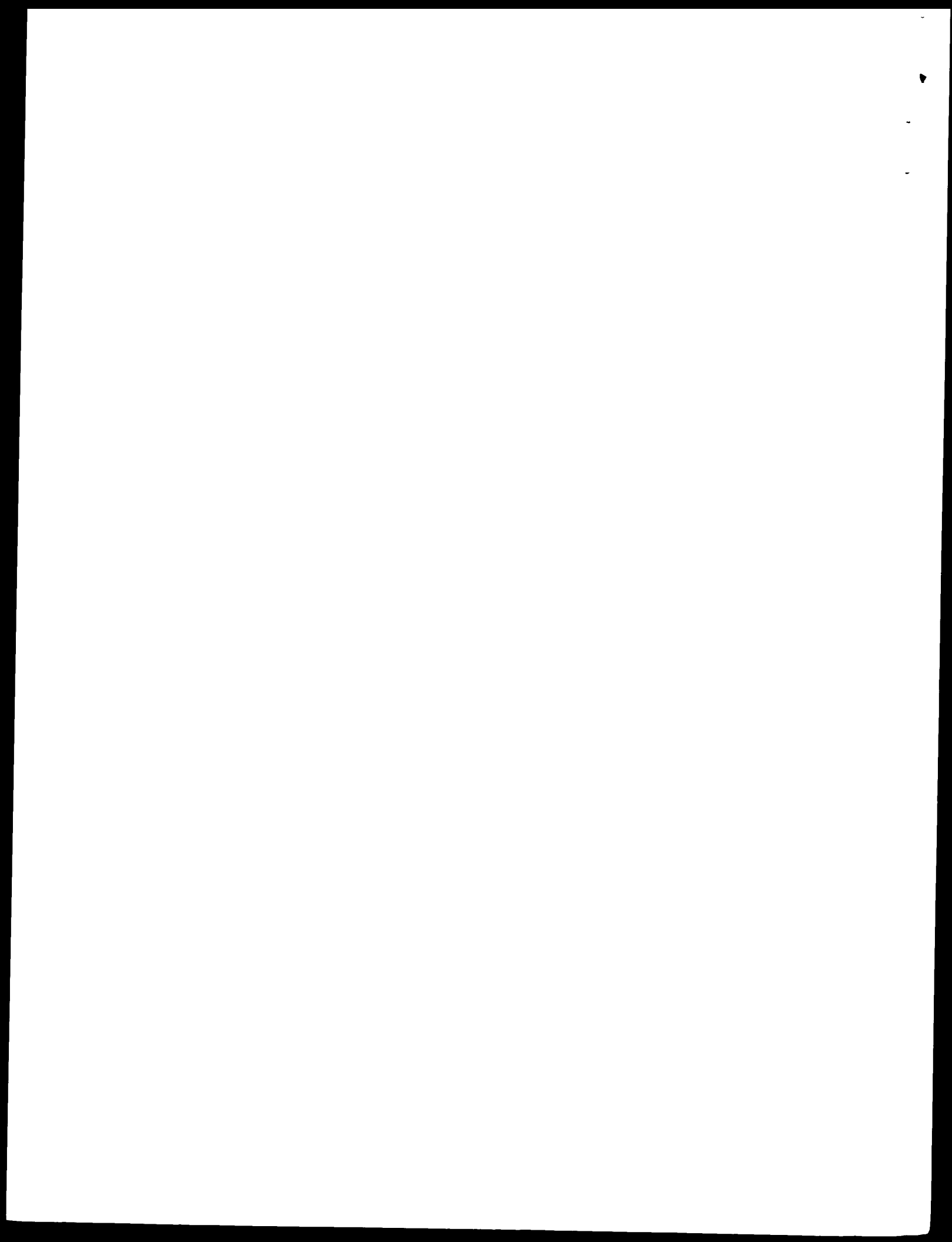
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages			
FILED 1-27-03	X <input checked="" type="radio"/> US 4 251 519 A (ROBBINS ERNEST A ET AL) 17 February 1981 (1981-02-17) *cf. abstract, col. 3, line 59 bridging with col. 4, lines 1-16, example 7 on col. 7* ---	1-3, 8-10,15, 16	A61K35/72 A61P3/06 A23L1/28 A23L1/30	
11ED 2 4-12-02	X <input checked="" type="radio"/> JP 03 030667 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 8 February 1991 (1991-02-08) *cf. Patent Abstracts of Japan with PN 03030667* ---	1-3, 8-10,15, 16		
3	X WO 92 13896 A (BIOGLUCANS L P) 20 August 1992 (1992-08-20) *cf. abstract, page 18, lines 24-30, table 2 on page 20, page 29, lines 1-15 ---	4-7, 11-14, 17-19		
4	X US 4 313 934 A (TANABE KOZO ET AL) 2 February 1982 (1982-02-02) *cf. abstract, col. 1, lines 5-12, col. 2, lines 55-67, col. 3, lines 34-39* ---	4-7, 11-14, 17-19	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)	
5	X PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 011, no. 193 (C-430), 20 June 1987 (1987-06-20) & JP 62 016424 A (ROOTO SEIYAKU KK), 24 January 1987 (1987-01-24) * abstract *	4-7, 11-14, 17-19	A61K A23L	
6	X PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 011, no. 357 (C-458), 20 November 1987 (1987-11-20) & JP 62 129223 A (TAIYO KAGAKU KK;OTHERS: 01), 11 June 1987 (1987-06-11) * abstract *	4-7, 11-14, 17-19		
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.				
3	Place of search MUNICH	Date of completion of the search 19 February 2003	Examiner Stoltner, A	
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document			T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)





DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
7 Y	US 4 739 046 A (DI LUZIO NICHOLAS R) 19 April 1988 (1988-04-19) *cf. abstract, col. 2, lines 8-25*	4-7, 11-14, 17-19	
8 Y	US 4 530 846 A (NAGODAWITHANA TILAK ET AL) 23 July 1985 (1985-07-23) *cf. abstract, col. 1, lines 13-24, claim 1*	4-7, 11-14, 17-19	
9 Y	WO 96 28476 A (KELLY GRAHAM EDMUND ;NORVET RESEARCH PTY LTD (AU)) 19 September 1996 (1996-09-19) *cf. abstract, page 9, lines 1-10, page 25, lines 29/30, page 34, 3rd para.*	4-7, 11-14, 17-19	
10 A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 07, 31 July 1997 (1997-07-31) & JP 09 077674 A (KAWASHIMA TAKAAKI;KATO SHIGERU), 25 March 1997 (1997-03-25) * abstract *	4-7, 11-14, 17-19	
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
3	Place of search MUNICH	Date of completion of the search 19 February 2003	Examiner Stoltner, A
<p>EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)</p> <p>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</p> <p>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</p> <p>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document</p>			



ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.

EP 00 94 6404

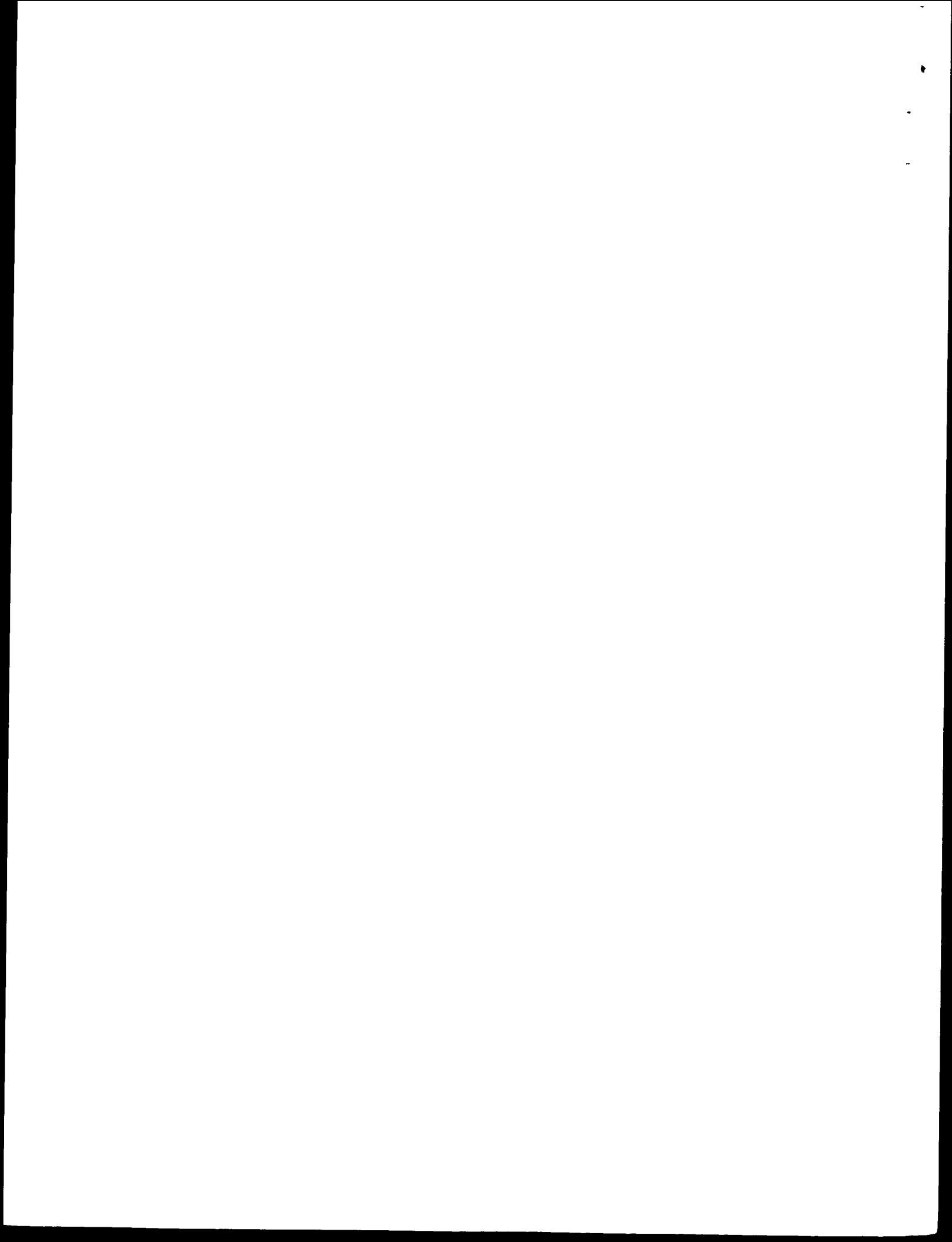
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

19-02-2003

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4251519	A	17-02-1981	NONE	
JP 03030667	A	08-02-1991	NONE	
WO 9213896	A	20-08-1992	AU 1455292 A WO 9213896 A1	07-09-1992 20-08-1992
US 4313934	A	02-02-1982	JP 1224274 C JP 55148097 A JP 58057153 B JP 1408832 C JP 55147224 A JP 62013929 B DE 3017372 A1 FR 2455893 A1 GB 2048918 A ,B	15-08-1984 18-11-1980 19-12-1983 24-11-1987 17-11-1980 30-03-1987 20-11-1980 05-12-1980 17-12-1980
JP 62016424	A	24-01-1987	NONE	
JP 62129223	A	11-06-1987	NONE	
US 4739046	A	19-04-1988	AT 71528 T AU 599045 B2 AU 6229686 A CA 1337408 A1 DE 3683479 D1 DK 198587 A EP 0232405 A1 FI 871718 A ,B, JP 2550332 B2 JP 63500805 T KR 9008442 B1 NO 871603 A ,B, US 4833131 A US 4761402 A US 4818752 A WO 8701037 A1 US 4877777 A US 4900722 A US 4975421 A	15-02-1992 12-07-1990 10-03-1987 24-10-1995 27-02-1992 18-06-1987 19-08-1987 16-04-1987 06-11-1996 24-03-1988 22-11-1990 15-06-1987 23-05-1989 02-08-1988 04-04-1989 26-02-1987 31-10-1989 13-02-1990 04-12-1990
US 4530846	A	23-07-1985	NONE	
WO 9628476	A	19-09-1996	AU 716181 B2 AU 4871596 A WO 9628476 A1	24-02-2000 02-10-1996 19-09-1996

EPO FORM P0459

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82



**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 00 94 6404

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

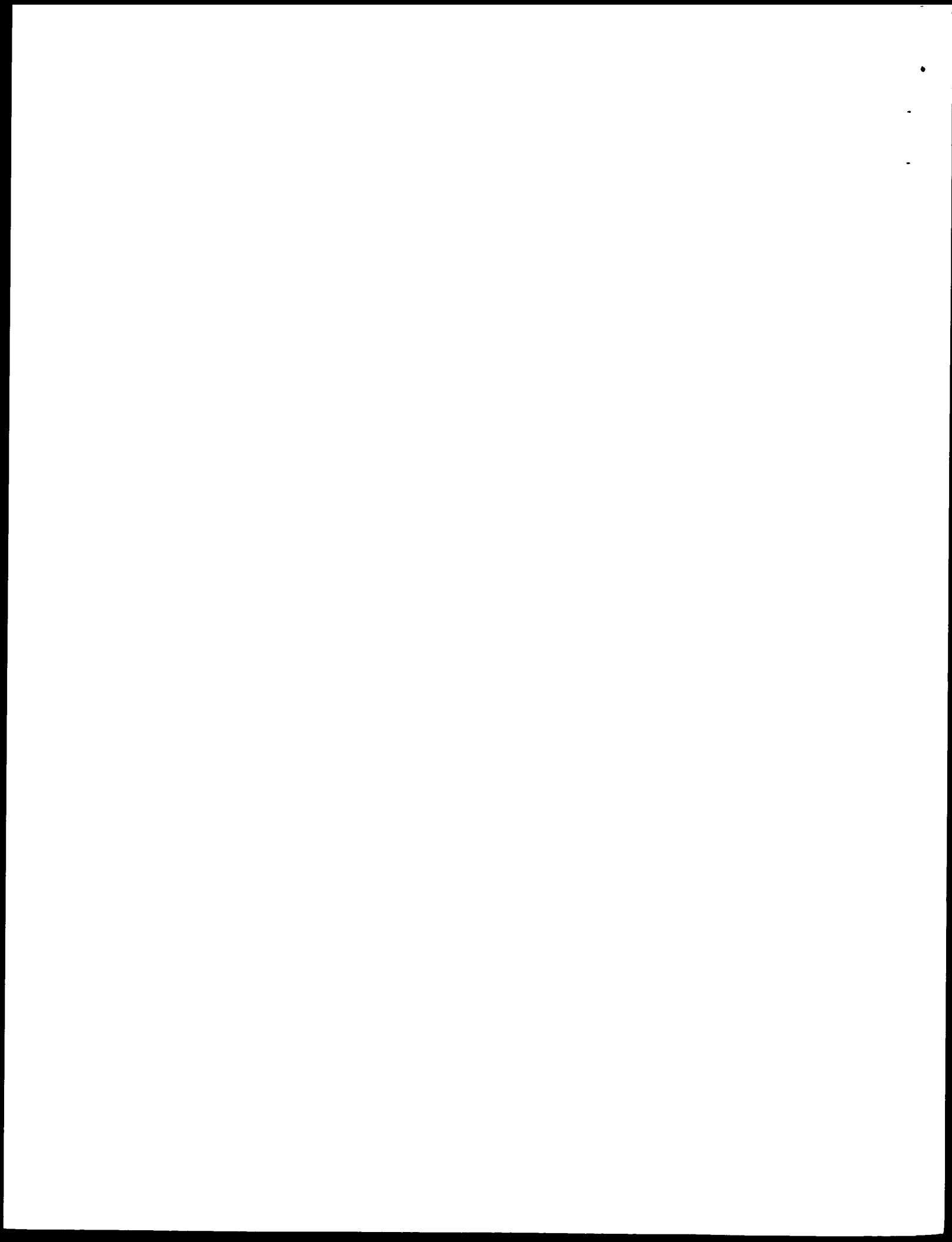
19-02-2003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9628476 A	CA	2214899 A1	19-09-1996
	EP	0815144 A1	07-01-1998
	GB	2314850 A ,B	14-01-1998
	GB	2331014 A ,B	12-05-1999
	JP	11501691 T	09-02-1999
	US	6242594 B1	05-06-2001

JP 09077674 A	25-03-1997	NONE	

EPO FORM P0459

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82





CLAIMS INCURRING FEES

The present European patent application comprised at the time of filing more than ten claims.

☐ Only part of the claims have been paid within the prescribed time limit. The present European search report has been drawn up for the first ten claims and for those claims for which claims fees have been paid, namely claim(s):

☐ No claims fees have been paid within the prescribed time limit. The present European search report has been drawn up for the first ten claims.

LACK OF UNITY OF INVENTION

The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

see sheet B

☒ All further search fees have been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for all claims.

☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the Search Division did not invite payment of any additional fee.

☐ Only part of the further search fees have been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for those parts of the European patent application which relate to the inventions in respect of which search fees have been paid, namely claims:

☐ None of the further search fees have been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for those parts of the European patent application which relate to the invention first mentioned in the claims, namely claims:

1
2
3
4



The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

1. Claims: 1-3, 8-10, 15-16

A cholesterol-lowering agent containing at least one yeast as an active ingredient, as well as the manufacture of a food or drink containing such cholesterol-lowering agent(s)

2. Claims: 4-7, 11-14, 17-19

A secondary bile acid production inhibitor containing a yeast as an active ingredient, use of said yeast for the manufacture of a secondary bile acid production inhibitor

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ARUGA, Mitsuyuki
Kyodo Bldg.
3-6, Nihonbashiningyocho 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0013
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 01 November 2000 (01.11.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference YK0019	
International application No. PCT/JP00/04843	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An **asterisk(*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
21 July 1999 (21.07.99)	11/206218	JP	12 Sept 2000 (12.09.00)
10 Marc 2000 (10.03.00)	2000/66659	JP	12 Sept 2000 (12.09.00)

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Tessadel PAMPLIEGA <i>Tdp</i></p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ARUGA, Mitsuyuki
Kyodo Bldg.
3-6, Nihonbashiningyocho 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0013
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 25 January 2001 (25.01.01)		
Applicant's or agent's file reference YK0019		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/04843	International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 21 July 1999 (21.07.99)
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
CA,CN,EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 25 January 2001 (25.01.01) under No. WO 01/05412

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38





67
Translation

Applicant's or agent's file reference YK0019	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04843	International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 21 July 1999 (21.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/72, A61P 3/06, A23L 1/28, 1/30		
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 08 December 2000 (08.12.00)	Date of completion of this report 28 March 2001 (28.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*☐ the international application as originally filed☒ the description:

pages _____ 1-49 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☒ the claims:

pages _____ 3-7,10-14,17-19 _____, as originally filed

pages _____ 1,2,8,9,15,16 _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:☐ contained in the international application in written form.☐ filed together with the international application in computer readable form.☐ furnished subsequently to this Authority in written form.☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:☐ the description, pages _____☐ the claims, Nos. _____☐ the drawings, sheets/fig _____5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 15-19

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 15-19
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matters of claim 15-19 relate to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international preliminary examination by the International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(iv).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 15-19

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-3 and 8-10

Document 1: JP, 3-30667, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 8 February, 1991 (08.02.91), full text, particularly claims (Family: none)

Document 2: EP, 462021, A (Chiba Flour Milling Co. Ltd.), 18 December, 1991 (18.12.91) & JP, 4-49243, A

Remarks

Document 1 describes that acid polysaccharide that is the ingredient composing the surface of candida kefir, an equivalent of yeast, is capable of adsorbing cholesterol and document 2 describes that LPS existing on the surfaces of fungus bodies such as yeast and other ascomycetes and various fungi is capable of lowering the cholesterol level in blood. Nevertheless, they do not describe that a yeast of the specific genus described in claims 1-3 and 8-10 has the cholesterol-lowering function in an in vivo system and this is not considered to be obvious to a person skilled in the art on the basis of these documents.

Claims 4-7 and 11-14

Document 3: Kazutomo Imabori et al. (editors), "A Dictionary of Bio-chemistry, the first edition" (A publication of K.K. Tokyo Kagaku Dojin, first printed in 1984), page 763, the "Biosynthesis of bile acid" section

In a drawing of document 3, the biosynthetic route of secondary bile acid is shown and it is considered to be well known to a person skilled in the art that secondary bile acid is biosynthesized from cholesterol by this route. According to the material submitted by the applicant on March 27, 2001, however, the level of cholesterol in the living body is not necessarily correlated to the amount of secondary bile acid, and it has been confirmed that there are a plurality of medicines which do not inhibit secondary bile acid despite their function to effectively lower cholesterol.

On the other hand, it is fully understood from the result of the pharmaceutical tests described in the specification of the present application that the yeast described in claims 4-7 and 11-17 of the present application inhibits the production of secondary bile acid when administered to living bodies. Thus, the subject matters described in these claims are not described in the documents cited in the ISR and are considered to be non-obvious from these documents.



(54) CANDIDA KEFYR AND CANDIDA TENUIS TO PRODUCE ACIDIC POLYSACCHARIDES HAVING CHOLESTEROL AND OXIDIZED CHOLESTEROL ADSORBING ABILITY AND ACIDIC POLYSACCHARIDES PRODUCED BY THE SAME FUNGI

- (11) 3-30667 (A) (43) 8.2.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-165077 (22) 27.6.1989
 (71) SNOW BRAND MILK PROD CO LTD (72) KENJI WATANABE(1)
 (51) Int. Cl⁵. C12N1/16, C08B37/00, C12P19/04//A23L1/30(C12N1/16, C12R1/72)(C12P19/04, C12R1/72)

NEW MATERIAL: Candida kefyra or candida tenuis capable of producing an acidic polysaccharide having cholesterol or oxidized cholesterol adsorbing ability.

EXAMPLE: Candida kefyra (FERM P-10731).

USE: A fungus capable of producing an acidic polysaccharide useful as cholesterol and oxidized cholesterol adsorbent. Producing the acidic polysaccharide in high yield.

PREPARATION: Being separated from kefyra granules useful as seed culture of alcoholic fermented milk drink.

(54) STABILIZATION OF PRESERVING LACTIC ACID BACTERIA, MATERIAL, SOLUTION AND FAT AND OIL COMPOSITION CONTAINED IN THE STABILIZED LACTIC ACID BACTERIA

- (11) 3-30668 (A) (43) 8.2.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-167266 (22) 29.6.1989
 (71) KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD (72) HIROAKI YAMAUCHI(7)
 (51) Int. Cl⁵. C12N1/20, C12N1/16, C12N1/38//C12N1/20, C12R1/01)(C12N1/20, C12R1/46)(C12N1/16, C12R1/865)

PURPOSE: To improve stabilization of preserving lactic acid bacteria and to obtain simply usable lactic acid bacteria having high activity and stability by blending and dispersing lactic acid bacteria into squeezed yeast.

CONSTITUTION: For example, lactic acid bacteria of genus Lactobacillus or Leuconostoc are blended and dispersed into squeezed yeast such as baker's yeast or wine yeast belonging to the genus Saccharomyces cerevisiae to stabilize the lactic acid bacteria. 10^6 - 10^{11} lactic acid bacteria are blended and dispersed into 1g squeezed yeast to give a stabilized lactic acid bacteria-containing material. As another stabilization of preservation, 10^5 - 10^{11} lactic acid bacteria are blended with a solution containing 0.1-30wt.% protein substance at pH4.0-6.0 to give a stabilized solution containing lactic acid bacteria and further 5-70 pts.wt. of the stabilized solution containing lactic acid bacteria as an aqueous phase part is blended with 95-30 pts.wt. fat and oil part and 0.1-0.5 pts.wt. emulsifying agent to give a stabilized lactic acid bacteria-containing fat and oil composition.

(54) MEDIUM ADDITIVE FOR ANIMAL CELL CULTURE, PRODUCTION AND ITS USE

- (11) 3-30669 (A) (43) 8.2.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-163731 (22) 28.6.1989
 (71) IWAKI GLASS K.K. (72) KAZUO II(2)
 (51) Int. Cl⁵. C12N5/06

PURPOSE: To obtain the subject additive providing a stronger promoting effect on cell multiplication than fetal calf serum in culture of human normal diploid fibroblast, Hera cell, Vero cell, etc., comprising a component adsorbed on heparin in mammalian plasma or serum.

CONSTITUTION: Plasma or serum of mammal such as bovine, horse, swine or goat is brought into contact with heparin and a component adsorbed on heparin is collected to give the objective additive.



PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 YK0019	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04843	国際出願日 (日.月.年) 19.07.00	優先日 (日.月.年) 21.07.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30		
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヤクルト本社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 3 ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 08.12.00	国際予備審査報告を作成した日 28.03.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 田村 聖子 印	4C 9051
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-49 ページ
 明細書 第 _____ ページ
 明細書 第 _____ ページ

出願時に提出されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 3-7, 10-14, 17-19 項
 請求の範囲 第 1, 2, 8, 9, 15, 16 項
 請求の範囲 第 _____ 項
 請求の範囲 第 _____ 項

出願時に提出されたもの
 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ
 図面 第 _____ ページ
 図面 第 _____ ページ

図、出願時に提出されたもの
 図、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図、_____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ

出願時に提出されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)という翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

3. この国際出願は、スクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 15~19

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 15~19 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲15~19は、治療による人体の体の処置方法に関するものであって、PCT第34条(4)(a)(i)及びPCT規則67.1(iV)の規定により、この国際予備審査機関が国際予備審査を行うことを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 15~19 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査を行うことができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-14

請求の範囲

有
無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-14

請求の範囲

有
無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-14

請求の範囲

有
無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-3、8-10について

文献1 JP, 3-30667, A(雪印乳業株式会社)8.2月.1991(08.02.91)全文、特に特許請求の範囲(ファミリーなし)

文献2 EP, 462021, A(CHIBA FLOUR MILLING CO. LTD.)18.12月.1991(18.12.91) & JP, 4-49243, A

備考

文献1には、酵母に相当するキャンジダ・ケフィアの表面を構成する成分である酸性多糖類にコレステロール吸着能があることが記載されており、文献2には、酵母等の子ノウ菌類や種々細菌等の菌体表面に存在するLPSに、血中コレステロール低下能のあることが記載されているが、本願の請求の範囲1-3、8-10に記載された特定の属の酵母についてはin vivoの系においてコレステロール低下作用のあることは記載されておらず、また、これらの文献から当業者に自明なものとも認められない。

請求の範囲4-7、11-14について

文献3 今堀 和友 外 監修「生化学辞典 第1版」(株式会社 東京化学同人発行)(1984年第1刷発行)P.763「胆汁酸の生合成(biosynthesis of bile acid)」の項

文献3の図には、二次胆汁酸の生体内合成経路が記載されており、当該経路によると、第二次胆汁酸は、コレステロールから生合成されることが当業者に周知のものと認められるが、出願人が2001年3月27日に提出した資料によると、生体内のコレステロール量と二次胆汁酸の量には必ずしも相関性が無く、コレステロールを低下作用を奏する薬であっても二次胆汁酸を抑制しない薬物も複数あることが確認できた。

一方、本願の請求の範囲4-7、11-14に記載の酵母は、生体に投与することにより二次胆汁酸の産生を抑制するものであることが、本願明細書に記載の薬理試験結果から十分に理解できるので、これらの請求の範囲に記載された発明は、国際調査報告にあげられた文献に記載されておらず、また、これらの文献から自明なものでもない。



請求の範囲

1. (補正後) イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイベロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母の1種又は2種以上を有効成分として含有するコレステロール低下剤。
2. (補正後) イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスポラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の1種又は2種以上を有効成分として含有するコレステロール低下剤。
3. 請求項1又は2記載の酵母を含有することを特徴とするコレステロール低下用飲食品。
4. 酵母を有効成分とする2次胆汁酸産生抑制剤。
5. 酵母がイサチェンキア属、クルイベロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒポピチア属、キャンジダ属、トルラスポラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる1種又は2種以上の酵母であることを特徴とする請求項4記載の2次胆汁酸産生抑制剤。
6. 酵母がイサチェンキア・オリエンタリス、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、クルイベロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒポピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスポラ・デルブルエッキー、ピチア・アノマラ、ピチア・ホルスチー、及びチゴサッカロマイセス・ロキシーから



15.75-00704843
選はれる 1 種又は 2 種以上の酵母であることを特徴とする請求項 4 記載の 2 次胆汁酸産生抑制剤。

7. 請求項 4 ～ 6 いずれか 1 項記載の酵母を含有してなる 2 次胆汁酸産生抑制用飲食品。

8. (補正後) イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイベロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母の 1 種又は 2 種以上のコレステロール低下剤製造のための使用。

9. (補正後) イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスポラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の 1 種又は 2 種以上のコレステロール低下剤製造のための使用。

10. 請求項 1 又は 2 記載の酵母のコレステロール低下用飲食品製造のための使用。

11. 酵母の 2 次胆汁酸産生抑制剤製造のための使用。

12. 酵母がイサチェンキア属、クルイベロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒポピチア属、キャンジダ属、トルラスポラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる 1 種又は 2 種以上の酵母である請求項 1 1 記載の使用。

13. 酵母がイサチェンキア・オリエンタリス、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、クルイベロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレピシエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒポピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスポラ・デルブルエッキー、ピチ



ア・アノマラ、ピチア・ホルスチー、バキチコスボラ・トランスバーレンシス及びチゴサッカロマイセス・ロキシーから選ばれる1種又は2種以上の酵母である請求項11記載の使用。

14. 請求項11～13のいずれか1項記載の酵母の2次胆汁酸産生抑制用飲食品製造のための使用。

15. (補正後) イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイペロマイセス属、ピチア属又はトルラスボラ属に属する酵母の1種又は2種以上を投与することを特徴とするコレステロール低下のための処置方法。

16. (補正後) イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイペロマイセス・マルキシアナス、クルイペロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスボラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の1種又は2種以上を投与することを特徴とするコレステロール低下のための処置方法。

17. 酵母を投与することを特徴とする2次胆汁酸産生抑制のための処置方法。

18. 酵母がイサチェンキア属、クルイペロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒボピチア属、キャンジダ属、トルラスボラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる1種又は2種以上の酵母である請求項17記載の方法。

19. 酵母がイサチェンキア・オリエンタリス、クルイペロマイセス・マルキシアナス、クルイペロマイセス・ラクチス、クルイペロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレピシエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒボピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスボラ・デルブルエッキー、ピチ



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YK0019	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04843	国際出願日 (日.月.年) 19.07.00	優先日 (日.月.年) 21.07.99
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヤクルト本社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）
法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15-19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲15～19は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT
第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iV)の規定により、この国際
調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしてい
ない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に
従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 3-30667, A (雪印乳業株式会社) 8. 2月. 1991 (08. 02. 91) 全文、特に特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-3, 8-10 4-7, 11-14
X Y	JP, 8-298982, A (株式会社アース技研) 19. 11月. 1996 (19. 11. 96) 【請求項1】、【0001】 (ファミリーなし)	1, 3, 8, 10 2, 4-7, 9, 11-14
Y	EP, 462021, A (CHIBA FLOUR MILLING CO. LTD.) 18. 12月. 1991 (18. 12. 9)	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 10. 00

国際調査報告の発送日

17.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452



C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
	1) & JP, 4-49243, A	
Y	JP, 50-68867, A (オリエンタル酵母工業株式会社) 9. 6月. 1975 (09. 06. 75) (ファミリーなし)	1-14
Y	今堀 和友 外 監修「生化学辞典 第1版」(株式会社 東京化学同人発行) (1984年第1刷発行) P. 763「胆汁酸の生合成 (biosynthesis of bile acid)」の項	1-14
A	US, 4891220, A (Immudyne, Inc.) 2. 1 月. 1990 (02. 01. 90)	1-14



67
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YK0019	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04843	International filing date (day month year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day month year) 21 July 1999 (21.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/72, A61P 3/06, A23L 1/28, 1/30		
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☐ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☐ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 December 2000 (08.12.00)	Date of completion of this report 28 March 2001 (28.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP00/04843

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-49 as originally filed
 pages _____ filed with the demand
 pages _____ filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 3-7,10-14,17-19 as originally filed
 pages 1,2,8,9,15,16 as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____ filed with the demand
 pages _____ filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____ as originally filed
 pages _____ filed with the demand
 pages _____ filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____ as originally filed
 pages _____ filed with the demand
 pages _____ filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

- These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP00/04843

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 15-19

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 15-19 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matters of claim 15-19 relate to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international preliminary examination by the International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(iv).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 15-19.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04843

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-3 and 8-10

Document 1: JP, 3-30667, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 8 February, 1991 (08.02.91), full text, particularly claims (Family: none)

Document 2: EP, 462021, A (Chiba Flour Milling Co. Ltd.), 18 December, 1991 (18.12.91) & JP, 4-49243, A

Remarks

Document 1 describes that acid polysaccharide that is the ingredient composing the surface of candida kefir, an equivalent of yeast, is capable of adsorbing cholesterol and document 2 describes that LPS existing on the surfaces of fungus bodies such as yeast and other ascomycetes and various fungi is capable of lowering the cholesterol level in blood. Nevertheless, they do not describe that a yeast of the specific genus described in claims 1-3 and 8-10 has the cholesterol-lowering function in an in vivo system and this is not considered to be obvious to a person skilled in the art on the basis of these documents.

Claims 4-7 and 11-14

Document 3: Kazutomo Imabori et al. (editors), "A Dictionary of Bio-chemistry, the first edition" (A publication of K.K. Tokyo Kagaku Dojin, first printed in 1984), page 763, the "Biosynthesis of bile acid" section

In a drawing of document 3, the biosynthetic route of secondary bile acid is shown and it is considered to be well known to a person skilled in the art that secondary bile acid is biosynthesized from cholesterol by this route. According to the material submitted by the applicant on March 27, 2001, however, the level of cholesterol in the living body is not necessarily correlated to the amount of secondary bile acid, and it has been confirmed that there are a plurality of medicines which do not inhibit secondary bile acid despite their function to effectively lower cholesterol.

On the other hand, it is fully understood from the result of the pharmaceutical tests described in the specification of the present application that the yeast described in claims 4-7 and 11-17 of the present application inhibits the production of secondary bile acid when administered to living bodies. Thus, the subject matters described in these claims are not described in the documents cited in the ISR and are considered to be non-obvious from these documents.



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 1 月 25 日 (25.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/05412 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 35/72, 石憲司 (OHISHI, Kenji) [JP/JP]. 伊藤雅彦 (ITO, Masahiko) [JP/JP]. 森 雅恵 (MORI, Wakae) [JP/JP]. 渡辺常一 (WATANABE, Tunekazu) [JP/JP]; 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社 ヤクルト 本社内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04843
- (22) 国際出願日: 2000 年 7 月 19 日 (19.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/206218 1999 年 7 月 21 日 (21.07.1999) JP
特願2000/66659 2000 年 3 月 10 日 (10.03.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 澤田治司 (SAWADA, Haruji) [JP/JP]. 吉田康人 (YOSHIDA, Yasuto) [JP/JP]. 和田康江 (WADA, Yasue) [JP/JP]. 大
- (74) 代理人: 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 補正書
— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CHOLESTEROL-LOWERING AGENTS, SECONDARY BILE ACID PRODUCTION INHIBITORS AND FOODS AND DRINKS

(54) 発明の名称: コレステロール低下剤、2次胆汁酸産生抑制剤及び飲食品

(57) Abstract: Secondary bile acid production inhibitors and cholesterol-lowering agents containing a yeast as the active ingredient.

(57) 要約:

酵母を有効成分とする 2 次胆汁酸産生抑制剤及びコレステロール低下剤。

WO 01/05412 A1



明 細 書

コレステロール低下剤、２次胆汁酸産生抑制剤及び飲食品

技術分野

本発明は、血中や肝臓のコレステロールを低下させ、動脈硬化指数を改善し得るコレステロール低下剤；大腸癌、肝癌、膵臓癌、胆石症等の予防及び治療に有用な２次胆汁酸産生抑制剤及びその飲食品への利用に関する。

背景技術

近年、循環器疾患による死亡率は年々増加しており、心筋梗塞、脳梗塞など動脈硬化に起因した疾患を合わせると、成人の死亡原因中第一位を占めている。

動脈硬化の原因としては様々なものがあるが、血漿脂質、特に血漿コレステロール値の上昇が最も重要な危険因子の一つとされている。

血漿コレステロール値の上昇原因としては、まず遺伝的な疾患がある。この場合、重篤な患者に対しては食事療法と同時にコレステロール合成阻害剤、ニコモール、クロフィブレート、イオン交換樹脂、蛋白同化ステロイド等の薬剤が使用されているが、これらの薬剤は、肝毒性、胃腸障害、発ガン性等の副作用がある。

血漿コレステロール値上昇のもう一つの大きな原因として、近年の卵、バター、肉等を大量に摂取する食生活による脂肪の過剰摂取があげられており、これは、若年齢層にも顕著になりつつある。食事性の高コレステロール血症の場合、通常は重篤な高コレステロール血症には至らないが、若齢期より血管に徐々にコレステロールが蓄積し、成人にいたって動脈硬化を引き起こすことが問題であり、高トリグリセライド血症とあいまって、心筋梗塞や脳梗塞を招く危険性がある。この種の高脂血症に対しては、副作用があるなど問題の多い薬物療法よりも、脂質摂取量を適正範囲に制限した食事療法が重視される。しかしながら、食事制限は

精神的苦痛を伴うと共に食生活の楽しみをうばうため厳格な実施は困難であり、効果には限界があることが多い。

血漿中に過剰に存在するコレステロールは血管壁に蓄積して動脈硬化を招くが、コレステロールが肝臓に取り込まれた後、そこに蓄積されることなく胆汁酸に変換されるかそのままの形で腸管に排出され、糞便と共に体外に排泄されるならば、体内コレステロールのプールも低下し、上記機構による動脈硬化は予防される。そこで、血漿コレステロール値の低下作用だけでなく、肝臓コレステロール値の低下作用を併せ持つものが期待されている。

一方、副作用が少なくコレステロール低下作用を示す微生物は、これまで種々の報告があるが、酵母に関する報告は意外に少ない。酵母といえば、古くからビール酵母が知られているが、その脂質代謝改善効果については、クロムを補添したビール酵母（1日当たり9g）を8週間、老人に投与した結果、血清コレステロール値の低下を認めたとの報告〔Ester G. Offenbacher and F. Xavier Pi-Sunyer, Beneficial effect of chromium-rich yeast on glucose tolerance and blood lipids in elderly subjects. *Diabetes*, 29, 919, (1980)〕があるが、塩化クロムと5gのビール酵母を10週間、老人に投与した結果、血清コレステロール値やTGに対して影響を与えなかったとの報告〔Caral J Rinko, and F. Xavier Pi-Sunyer, The effects of inorganic chromium and brewer's yeast on glucose tolerance, plasma lipids, and plasma chromium in elderly subjects., *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 454, (1985)〕やクロムを補添していないビール酵母を使用した対人試験では血清コレステロール値の低下効果はなかったとの報告〔Arne T. Hostmark, Einar Eilertsen and Ole Gronnerod, Plasma lipid and lipoprotein responses of rats to starch and sucrose diets with and without brewer's yeast., *J. Nutr.*, 109, 1073, (1978)〕がある。また、ウサギの餌に大豆蛋白を混ぜて投与すると血清コレステロール値が低下するが、その大豆蛋白の50%をビール酵母で置換すると血清コレステロール値が逆に若

干上昇したとの報告 [Jorge De Abreu and Nancy Millan, Effect of addition of brewer's yeast to soy protein and casein on plasma cholesterol levels of rabbits. Archivos Latinoamericanos de Nutricion., 44, 18, (1994)] もある。

このように現在のところ、ビール酵母 (brewer's yeast) の脂質代謝改善効果については統一的な見解が得られていない。

一方、他の酵母では、酵母のメタノール抽出物が、赤色酵母 (Sporobolomyces ruberrinus) と Saccharomyces uvarum において、わずかにコレステロール負荷ラットの血清コレステロール値及びトリグリセライド値を減少させたとの報告 [長 修司、藤井久雄、白石淳、納豆菌産生多糖類あるいは酵母のアルコール抽出物がラットの脂質代謝に及ぼす影響、福岡女子大学家政学部紀要、16, 65, (1984)] があり、更に Saccharomyces cerevisiae の培養上清がマウスの血清コレステロールを低下させたという報告 [岸田忠昭、Saccharomyces cerevisiae 培養物の血清コレステロール低下作用について、栄養と食糧、26, 371, (1973)] がある。

しかしながら、ビール酵母以外にコレステロール低下作用を示す酵母の報告は、いまだ少なくまた、酵母の菌体そのもの、或いはその菌体構成成分が脂質代謝改善効果を示したという報告はない。

また、ヒトの肝臓においてコール酸及びケノデオキシコール酸等 (1 次胆汁酸) がコレステロールから合成され、グリシン又はタウリンと抱合しグリシン又はタウリン抱合型胆汁酸として胆管を通過して消化管に分泌される。胆汁酸は、その界面活性作用によって飲食品中の脂質を乳化分散させ、膵液の酵素・リパーゼによる分解と吸収を促進し、回腸から能動的に再吸収される。再吸収された胆汁酸は、門脈を通過して肝臓に戻り、再度、消化管に分泌され腸肝循環を構成し、この循環を繰り返す。

回腸からの吸収を免れた胆汁酸は、腸内細菌によって脱抱合や 7α -脱水酸化、

酸化、還元、エピマー化等の修飾を受けて2次胆汁酸へと変換される。この過程で生じる主要な2次胆汁酸は、デオキシコール酸とリトコール酸であり、それぞれ1次胆汁酸であるコール酸とケノデオキシコール酸の7 α -脱水酸化反応によって生じる。2次胆汁酸の一部は、大腸から受動的に吸収されて肝臓に移行し1次胆汁酸と同様に腸肝循環を繰り返すが、残りの胆汁酸は糞便中へと排泄される。

近年、大腸管腔内の腸内細菌によって産生されるデオキシコール酸やリトコール酸などの2次胆汁酸は、大腸癌、肝癌、膵臓癌、胆管癌などの発症に深く関与していることが明らかになっている。一般に、発癌の過程は、化学発癌剤や放射線、ウィルスなどによって遺伝子に突然変異が生じるイニシエーションと、その後、プロモーターに長期間、暴露されることによって増殖と分化に異常が生じるプロモーションの2段階から成り立つと考えられている。これまでに、デオキシコール酸やリトコール酸等の2次胆汁酸は、後者の過程においてプロモーターとして作用し、大腸癌、肝癌、膵臓癌、胆管癌の発症を促進することが報告されている (Narisawa, T., et. al., J. Natl. Cancer Inst., 53, 1093-1097, 1974, Tsuda, H., et. al., Gann, 75, 871-5, 1984, Makino, T., et. al., J. Natl. Cancer Inst., 76, 967-75, 1986)。また、2次胆汁酸の発癌プロモーター活性は、1次胆汁酸に比べてはるかに強いことも示されている (Narisawa, T., et. al., J. Natl. Cancer Inst., 53, 1093-1097, 1974, Reddy, BS., et. al., Cancer Res., 37, 3238-3242, 1977)。さらに、最近、デオキシコール酸に関しては、癌以外にも胆石症の発症に関係し得ることが示されている (Marcus, SN., Heaton, KW., Gut, 29, 522-533, 1988)。

このように、大腸管腔内において腸内細菌によって産生されるデオキシコール酸やリトコール酸などの2次胆汁酸は、強力な発癌プロモーター活性を有すると同時に、胆石症の原因にもなり得ることから、2次胆汁酸の産生を抑制することによって、大腸癌、肝癌、膵臓癌、胆管癌、胆石症などの疾患を予防あるいは治療することが可能である。

これまでに、ペニシリン系の抗生物質であるアンピシリン (Low-Beer, TS., Nutter, S., Lancet, 2(8099), 1063-1065, 1978)、 $3\alpha, 12\beta$ -ジヒドロキシ- 5β -コラン-24-N-メチルアミン (Roda, A., et. al., J. Pharm. Sci., 81, 237-240, 1992)、オリゴ糖の一種であるラクツロース (Magengast, FM., Eur. J. Clin. Invest., 18, 56-61, 1988) あるいは小麦糠 (Lampe, JW., et. al., Gut, 34, 531-536, 1993) については、効果は弱いものの2次胆汁酸の産生を抑制することが報告されている。

アンピシリン及び $3\alpha, 12\beta$ -ジヒドロキシ- 5β -コラン-24-N-メチルアミンは、大腸管腔内において 7α -脱水酸化反応を触媒する細菌を排除することによって2次胆汁酸の産生を抑制するが、長期間服用した際には耐性菌の出現や副作用の発現が問題となる。また、抗生物質を用いて、2次胆汁酸の産生に関わる細菌のみを特異的に排除することは事実上不可能であり、乳酸菌やビフィズス菌などのヒトの健康維持に重要な役割を果たしている腸内細菌も同時に排除してしまうといった重大な問題を生ずる欠点がある。

一方、ラクツロースや小麦糠は、主に大腸管腔内のpHを低下させることによって至適pHが中性付近である 7α -脱水酸化酵素の活性を抑制し、2次胆汁酸の産生量を低下させると考えられている。しかし、これらの物質は、有効性の面で未だ十分ではなく、疾病の予防及び治療に寄与し得る程の効果を示していない。

従って、本発明の目的は、副作用が少なく安全な酵母を用い、血中や肝臓のコレステロールを有効に低下し得るコレステロール低下剤を提供することにある。

また、本発明の他の目的は、大腸癌、肝癌、膵臓癌、胆管癌、胆石症などの疾患の予防あるいは治療に有用な、有効性及び安全性の優れた2次胆汁酸産生抑制剤を提供するものである。

発明の開示

本発明者は、鋭意研究を行った結果、下記に示す特定の属に属する酵母が、副

作用が少なく、血中及び肝臓中のコレステロールを有効に低下する作用を有することを見出した。また、酵母が1次胆汁酸の2次胆汁酸への変換を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明はキャンジダ属、イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイベロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母の1種又は2種以上を有効成分として含有するコレステロール低下剤、及びこれ含有する飲食品を提供するものである。

また、本発明はこれら特定の酵母のコレステロール低下剤及びコレステロール低下用飲食品製造のための使用を提供するものである。

また本発明はこれら特定の酵母を投与することを特徴とするコレステロール低下のための処置方法を提供するものである。

また、本発明は、酵母を有効成分とする2次胆汁酸産生抑制剤及びこれ含有する飲食品を提供するものである。

また本発明は酵母の2次胆汁酸産生抑制剤及び2次胆汁酸産生抑制用飲食品製造のための使用を提供するものである。

さらに本発明は酵母を投与することを特徴とする2次胆汁酸産生抑制のための処置方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、コレステロール添加食と無添加食投与群の血漿コレステロール値を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のコレステロール低下剤又は飲食品に用いる酵母は、キャンジダ属、イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイベロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母であり、これらは1種でも、2種以上

ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母であり、これらは1種でも、2種以上を混合して用いてもよい。上記酵母は生菌、加熱菌体、凍結乾燥物、それらの破砕物、それらの構成物であってもよい。

上記の属に属する酵母のうち、好ましいものとしては、例えばキャンジダ・ケフィア、イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ、トルラスポラ・デルブルエッキーが挙げられ、更にこれらのうち次の酵母が最適である。

キャンディダ ケフィア (Candida kefir) Y I T 8 2 3 7 (FERM BP-7214、原寄託日 1999 年 7 月 16 日、寄託機関 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、郵便番号 305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(以下同じ))、ハンセニアスポラ ウヴァラム (Hanseniaspora uvarum) Y I T 8 1 6 4 (FERM BP-7212、原寄託日 1999 年 7 月 16 日)、イサチェンキア オリエンタリス (Issatchenkia orientalis) Y I T 8 2 6 6 (FERM BP-7215、原寄託日 1999 年 7 月 16 日)、クロエッケラ アフリカーナ (Kloeckera africana) Y I T 8 1 6 5 (FERM BP-7213、原寄託日 1999 年 7 月 16 日)、クルイベロマイセス マルキシアナス (Kluyveromyces marxianus) Y I T 8 2 9 2 (FERM BP-7217、原寄託日 1999 年 7 月 16 日)、クルイベロマイセス ラクチス (Kluyveromyces lactis) Y I T 8 2 6 3 (FERM BP-7216、原寄託日 1999 年 7 月 16 日)、ピチア ファリノサ (Pichia farinosa) Y I T 8 0 5 8 (FERM BP-7210、原寄託日 1999 年 7 月 16 日)、トルラスポラ デルブルエッキー (Torulaspora delbrueckii) Y I T 8 1 1 4 (FERM BP-7211、原寄託日 1999 年 7 月 16 日)。

なお、これらの微生物は食品(ワイン、乳酒、チーズ)製造に使用される酵母として古くから知られており、人体に対して極めて安全な菌株である。

上記菌株の性状を示すと表1～表5の通りであって、「ザ イースト (The

yeast)、第3版 N. J. W. Kreger-Van Rij, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1984」に記載の同種微生物の性状とほぼ同様である。

表1
菌株の性状

菌 株	キャンジダ ケフィア YIT 8237	ハンセンアスボ ラ ウザラム YIT 8164	イサチエンキア オリエンタリス YIT 8266	クロエツケラ アフリカーナ YIT 8165	クレイバロマイセ ス マルキシアナ ス YIT 8292	クルイバロマイ セス ラクサス YIT 8263	ピチア フ アリノサ YIT 8058	トルラスボラ デ ルブルエツキー YIT 8114
D-グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ガラクトース	+	-	-	-	-	+	-	+-
マルトース	-	-	-	-	-	-	-	+-
Me- α -D-グルコシド		-	-		-	-	-	+-
シュエクロース	+	-	-	-	-	+-	+	+-
α , α -トレハロース		-	-		+	-	-	+-
メリビオース		-	-		-	-	-	-
ラクトース	+-	-	-	-	-	+	+	-
セロビオース		+	-		-	-	-	-
メレチトース		-	-		-	-	-	+-
ラフィノース	+-	-	-		-	-	-	+-
イヌリン	+	-	-		-	-	-	-
澱粉		-	-		-	-	-	-
D-キシロース		-	-		-	-	-	+
D-グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ガラクトース	+	-	+-	-	+	+	+	+-
D-ソルボース	-	-	-		+-	+	+-	+-
D-グルコサミン		-	-		-	-	-	+-
D-リボース	+-	-	-	-	+-	-	+	-

発酵性

増殖性

表2

菌 株	キャンジダ ケツイア YIT 8237	ハンセニアスボ ラ ウヴァラム YIT 8164	イサチエンキア ナリエンタリス YIT 8266	クロエツケラ アフリカーナ YIT 8165	クリイペロマイセ ス マルキシアナ ス YIT 8292	クリイペロマイ セス ラクチス YIT 8263	ピチア ナリナ YIT 8058	トリコスポラ リノエツキ YIT 8114
D-キシロース	+-	-	-	-	+-	-	+-	-
L-アラビノース	+-	-	-	-	-	-	-	-
D-アラビノース	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ラムノース	-	-	-	-	+-	-	+-	-
シュウクロース	+	-	+	+-	+	+	+	+-
マルトース	-	-	-	+	-	+	-	+-
α 、 α -D-グルコ ピロース	+-	-	-	-	+-	+	+-	+
Me- α -D-グルコ ピロース	+-	-	-	-	-	+	-	+-
セロピロース	+-	+	-	+	+-	+	+-	-
サリシン	+-	-	-	-	+-	+	+-	-
アルブチン	-	+	-	-	+-	+	+-	-
メリピロース	-	-	-	-	-	-	-	+-
ラクトース	+	-	+-	-	+	+	+	-
ラフィノース	+	-	-	-	-	+	-	+-
メレチトース	-	-	-	-	-	+	-	+-
イヌリン	-	-	-	-	-	-	-	+-
澱粉	-	-	-	-	-	-	-	-
グリセロール	+-	-	+	-	+	+	+	+-
エリスリトール	-	-	-	-	+	-	+	-
リビトール	-	-	-	-	+	-	+	-
キシリトール	-	-	-	-	+	+	+	+-

増殖性

表3

菌 株	キャンジダ ゲフィア YIT 8237	ハンセニアスボ ラ ウグアラム YIT 8164	イサチエンキア ザリエンタリス YIT 8266	クロエツケラ アフリカーナ YIT 8165	クルイペロマイセ ス マルキシアナ ス YIT 8292	クルイペロマイ セス ラクサス YIT 8263	ピチア アフリナ YIT 8058	トルラスボラ ルアルエッキ YIT 8114
増殖性	レーアラビニートール	-	-		-	-	-	-
	D-グルシトール	+-	-		+	+	+	-
	D-マンニトール	+-	-	-	+	+	+	+-
	ガラクシトール	-	-		-	-	-	-
	ミオイノシトール	-	-		-	-	-	-
	D-グルコノ-1,5-ラクトン	+	-		+	-	+	+-
	2-ケト-D-グルコネート	+	-	-	+-	-	+-	+
	D-グルコネート	-	-		+	-	+	-
	D-グルクロネート	-	-		+	-	-	-
	D-ガラクトツクロネート	-	-		+	-	-	-
	DL-ラクテート	+	+		-	+	-	+-
	スクシネート	+-	+		+-	+	+	-
	サイトレート	+-	+-	-	+	+-	-	-
	メタノール	-	-		-	-	-	-
	エタノール	-	+		+	+	+	+
	プロパン-1,2-ジオール	-	-		-	-	-	-
	ブタン-2,3-ジオール	-	-		-	+	-	-
増殖性	ナイトレート	-	-		-	-	-	-
	ナイトライイト	-	-		-	-	-	+-
	エチルアミン	+	+		+	+	+	+-
	L-リジン	+	+		+	+	+	+

表4

菌 株	キャンジダ ケフィア YIT 8237	ハンセニアスボ ラ ヴァギラム YIT 8164	イサチエンキア オリエンタリス YIT 8266	クロエッケラ アフリカーナ YIT 8165	クルイペロマイセ ス マルキシアナ ス YIT 8292	クルイペロマイ セス ラクチス YIT 8263	ピチア マリナ YIT 8058	トリラスボラ リノグリス YIT 8114
カタペリン		+	+		+	+	+	-
クレアチン		-	-		-	-	-	-
クレアチニン		-	-		-	-	-	-
グルコサミン		-	-		-	-	-	-
イミダゾール		-	-		-	-	-	-
W/O ビタミン		-	+		+-	-	+-	+-
W/O ミオイノシトール		-	+		+	+	+	+
W/O ビタミン酸		-	+		+	+	+	+
W/O ビタミン		+-	+		+	+-	+	+-
W/O チアミン		+-	+		+-	+	+-	+
W/O ビタミン & チアミン		-	+		+-	+-	+-	+-
W/O ビリドキシン		-	+		+	+	+	+
W/O ビリドキシン & チアミン		-	+		+-	+-	+-	+-
W/O ナイアシン		-	+		+	-	+	+
W/O PABA		+	+		+	+	+	+
25°C	+	+	+		+	+	+	+
30°C	+	+	+		+	+	+	+
35°C	+	-	+	+	+	+	+	+-
37°C	+	-	+	-	+	+	+	+-
40°C	+	-	+		+	-	+	-
0.01% シクロヘキシミド		+	-		-	+	-	-

増殖性

表5

	菌 株	キャンジダ ケフィア YIT 8237	ハンセニアスボ ラ ウヴァテラム YIT 8164	イサチエンキア オリエンタリス YIT 8266	クロエックラ アフリカーナ YIT 8165	クルイペロマイセ ス マルキシアナ ス YIT 8292	クルイペロマイ セス ラクサス YIT 8263	ピチア フ アリノサ YIT 8058	トルラスボラ ルブルエッキ YIT 8114
増殖性	0.1%シクロヘキシミド		+	-		-	+	-	-
	1%酢酸		-	-		-	-	-	-
	50%D-グルコース		+-	-	+	+	-	+	+
	60%D-グルコース		-	-		+	-	+	+-
他の性質	澱粉産生	-	-	-		-	-	-	-
	酢酸産生	-	-	-		-	-	-	-
	尿素加水分解	-	-	-		-	-	-	-
	ジアンニウムブルーB反応	-	-	-		-	-	-	-

次に本発明の2次胆汁酸産生抑制剤に用いられる酵母について説明する。

2次胆汁酸産生抑制剤に用いられる酵母は特に限定されず、また酵母には、酵母を培養して得られる生菌体、加熱菌体、凍結乾燥物、それらの破砕物、及びそれらの構成物が含まれる。

本発明で使用する酵母が、コール酸等の7 α -水酸基を脱離する反応を阻害し、2次胆汁酸であるデオキシコール酸等の生成を阻害するということは今迄報告されていない。本発明は、酵母の1次胆汁酸の2次胆汁酸への変換を抑制阻害する作用を利用したもので、特にコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、ケノデオキシコール酸等の1次胆汁酸吸着能、あるいは酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸の腸内濃度上昇能に優れた酵母は、7 α -水酸基脱離反応を阻害する効果が優れ好ましい。

2次胆汁酸産生抑制剤については、酵母のうち、好ましいものとしてはイサチエンキア属、クルイベロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒポピチア属、キャンジダ属、トルラスポラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属に属する酵母が挙げられ、これらは1種又は2種以上を混合して用いることができる。

具体的には、イサチエンキア・オリエンタリス、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、クルイベロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・ハヤナス、ヒポピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスポラ・デルブルエッキー、ピチア・アノマラ、ピチア・ホルスチー及びチゴサッカロマイセス・ロキシーが好ましいものとして挙げられ、更にこれらのうち次の酵母が最適である。

イサチェンキア オリエンタリス (Issatchenkia orientalis) Y I T 8 2 6 6
(FERM BP-7215)、クルイベロマイセス マルキシアナス (Kluyveromyces marxianus) Y I T 8 2 9 2 (FERM BP-7217)、クルイベロマイセス ラクシス
(Kluyveromyces lactis) Y I T 8 2 6 3 (FERM BP-7216)、クルイベロマイセ
ス サーモトレランス (Kluyveromyces thermotolerans) Y I T 8 2 9 4 (AT
CC 20309)、ハンセニアスポラ ウウアラム (Hanseniaspora uvarum)
Y I T 8 1 6 4 (FERM BP-7212)、サッカロミセス セレビシエ
(Saccharomyces cerevisiae) Y I T 8 1 1 6 (ATCC 48554)、サッ
カロミセス ダイレンシス (Saccharomyces dairensis) Y I T 8 1 9 1 (CB
S 3007)、サッカロミセス エキシグース (Saccharomyces exiguus) Y I
T 8 1 0 9 (CBS 3019)、サッカロミセス ユニスポラス
(Saccharomyces unisporus) Y I T 8 2 2 6 (FERM BP-7209、原寄託日1999年
3月25日、寄託機関 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、郵便番号
305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)、サッカロミセス バヤナ
ス (Saccharomyces bayanus) Y I T 8 1 2 8 (CBS 380)、ヒポピチア
ブルトニ (Hyphopichia burtonii) Y I T 8 2 9 9 (CBS 2352)、キャ
ンジダ ケフィア (Candida kefyr) Y I T 8 2 3 7 (FERM BP-7214)、キャンジ
ダ エチエルシー (Candida etchellsii) Y I T 8 2 7 8 (ATCC 6011
9)、キャンジダ ゼイラノイデス (Candida zeylanoides) Y I T 8 0 1 8 (I
FO 0719)、キャンジダ ソラニ (Candida solani) Y I T 8 0 2 3 (C
BS 1908)、キャンジダ マルトーサ (Candida maltosa) Y I T 8 2 8 3
(ATCC 28140)、キャンジダ トロピカリス (Candida tropicalis)
Y I T 8 2 8 6 (CBS 94)、キャンジダ シリンドラシエ (Candida cylindracea) Y I T 8 2 7 6 (ATCC 14830)、キャンジダ ユチリ
ス (Candida utilis) Y I T 8 2 0 4 (ATCC 9950)、トルラスポラ
デルブルエッキー (Torulaspora delbrueckii) Y I T 8 3 1 3 (JCM 22

04) 及びY I T 8 1 3 3 (I F O 1 1 7 2)、ピチア アノマラ (Pichia anomala) Y I T 8 2 9 8 (J C M 3 5 8 7) 及びY I T 8 2 9 7 (J C M 3 5 8 3)、ピチア ホルスチー (Pichia holstii) Y I T 8 0 3 8 (A T C C 5 8 0 4 8)、及びチゴサッカロマイセス ロキシー (Zygosaccharomyces rouxii) Y I T 8 1 2 9 (C B S 7 3 2)。

なお、これらの酵母は古くから食品（ワイン、チーズ）の製造に使用されており、人体に対して極めて安全な微生物である。また、これらの菌体は、数ミクロンの粒子なので、食感に影響する20ミクロン以上の粒子に比べてはるかに服用し易いという特徴を有している。上記酵母の性状として、イサチェンキア・オリエンタリス (*Issatchenkia orientalis*) Y I T 8 2 6 6 (FERM BP-7215) の性状を具体的に示すと、表1の通りであって、「ザ イースト (The yeast)、第3版 N. J. W. Kreger-Van Rij, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1984」に記載の同種酵母の性状と同様である。

表6

イサチエンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の性状

発酵性					
D-グルコース	+	メリビオース	-	クレアチン	-
D-ガラクトース	-	ラクトース	+-	クレアチニン	-
マルトース	-	ラフィノース	-	グルコサミン	-
Me- α -D-グルコース	-	メレチトース	-	イミダノール	-
シュークロース	-	イヌリン	-	W/O ビタミン	+
α , α -トレハロース	-	澱粉	-	W/O ミオイノシトール	+
メリビオース	-	グリセロール	+	W/O パントテン酸	+
ラクトース	-	エリスリトール	-	W/O ビオチン	+
セロビオース	-	リヒトール	-	W/O チアミン	+
メレチトース	-	キシリトール	-	W/O ビオチン&チアミン	+
ラフィノース	-	L-アラビニトール	-	W/O ヒリドキシン	+
イヌリン	-	D-グルシトール	-	W/O ヒリドキシン&チアミン	+
澱粉	-	D-マンニトール	-	W/O ナイアシン	+
D-キシロース	-	ガラクシトール	-	W/O PABA	+
増殖性		ミオイノシトール	-	25℃	+
D-グルコース	+	D-グルコノ-1,5-ラク トン	-	30℃	+
D-ガラクトース	+-	2-ケト-D-グルコネート	-	35℃	+
L-ソルボース	-	D-グルコネート	-	37℃	+
D-グルコサミン	-	D-グルクロネート	-	40℃	+
D-リボース	-	D-ガラクツロネート	-	0.01% シクロヘキシミド	-
D-キシロース	-	DL-ラクテート	+	0.1% シクロヘキシミド	-
L-アラビノース	-	スクシネート	+	1% 酢酸	-
D-アラビノース	-	サイトレート	+-	50% D-グルコース	-
L-ラムノース	-	メタノール	-	60% D-グルコース	-
シュークロース	+	エタノール	+	他の性状	
マルトース	-	プロパン-1,2-ジオール	-	澱粉産生	-
α , α -トレハロース	-	ブタン-2,3-ジオール	-	酢酸産生	-
Me- α -D-グルコシド	-	ナイトレート	-	尿素加水分解	-
セロビオース	-	ナイトライト	-	ジアゾニウムブルーB 反応	-
サリシン	-	エチルアミン	+		
アルブチン	-	L-リジン	+		
		カダベリン	+		

本発明に用いる酵母は、通常の方法、例えば酵母エキスやポリペプトンを含む複合培地又は無機塩を主体とする合成培地で培養することによって製造することができる。

このようにして得られた酵母は、生菌もしくはその凍結乾燥物、又は加熱処理等を施した死菌体、それらの破砕物、更にはそれらの構成物として、医薬組成物又は飲食品に用いることができる。また、本発明に用いる酵母は、市販のものであってもよい。

上記酵母は、常法に従って薬学的に許容される担体とともに種々の剤型の医薬

組成物とすることができる。例えば、経口用固形製剤を調製する場合には、上記酵母に賦形剤、必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤等を加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を製造することができる。そのよう添加剤としては、当該分野で一般的に使用されるものでよく、例えば、賦形剤としては、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸等を、結合剤としては、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等を、崩壊剤としては乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖等を、滑沢剤としては精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコール等を、矯味剤としては白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸等が例示できる。

経口用液体製剤を調製する場合は、上記酵母に矯味剤、緩衝剤、安定化剤、矯臭剤等を加えて常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等を製造することができる。この場合矯味剤としては上記に挙げられたもので良く、緩衝剤としてはクエン酸ナトリウム等が、安定化剤としてはトラガント、アラビアゴム、ゼラチン等が挙げられる。

また、本発明の飲食品は、上記酵母を種々の飲食品に添加せしめることにより製造することができる。ここで好ましい飲食品としては、発酵乳、果汁飲料、スープ、せんべい、クッキー等が例示される。なお飲食品には動物の飼料も含まれる。

上記の各製剤中に配合されるべき酵母の量は、これを適用すべき患者の症状によりあるいはその剤型等により一定ではないが、一般に製剤中1～100重量%とするのが望ましい。また、上記製剤又は飲食品の1日あたりの投与量は、患者

の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概には決定できないが、酵母として通常成人1日あたり約10mg～30g、好ましくは約1～5gとすれば良く、これを1日1回又は2～4回程度に分け投与するのが好ましい。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。なお、「%」は「重量%」を示す。

実施例1

(イ) 酵母の調製

ポテトデキストロース寒天スラントで保存している各種酵母のそれぞれの1白金耳を、表7に示す培地100mLを含むそれぞれの坂口フラスコ(500mL)に植菌し、30℃で振とう培養(120spm)した。

2日後に10リッター発酵槽(実働容積7L)に坂口フラスコ2本分を接種して30℃にて、通気速度0.5vvm、回転速度250rpm、pH6.0(5Nの水酸化ナトリウムで自動制御)の条件下で2日間、通気攪拌培養した。

培養終了後、冷却遠心分離機を使用して菌体と上清を分けたのち、菌体を蒸留水で2度洗浄した。この洗浄菌体を2リッターの三角フラスコに入れ、蒸留水1リッターを加えた後、115℃にて10分間オートクレーブで加熱した。この加熱菌体をそのまま凍結乾燥した。

表7

前培養及び本培養の培地組成

グルコース(関東化学製)	30g
ポリペプトン(第五栄養株式会社製)	10g
酵母エキス(第五栄養株式会社製)	5g
リン酸1カリウム(和光純薬製)	1g
リン酸2カリウム(和光純薬製)	2g
硫酸マグネシウム(和光純薬製)	0.5g
水道水	1L
pH6.0	

(ロ) 試験飼料の調製

(イ) で製造した酵母を用い、下記表 8 の組成の飼料を常法により混合し調製した。各試験飼料ともコレステロール 0.5%、コール酸ナトリウム 0.25% を含むコレステロール添加食とし、酵母含有飼料には酵母凍結乾燥菌体 5% 又は 10% を添加した。

表 8

飼料組成 (% 表示)

成 分	対照群	10%酵母群	5%酵母群
カゼイン	22.30	17.35	19.83
大豆油	1.0	1.0	1.0
ラード	10.0	9.45	9.72
無機塩	4.0	3.54	3.77
ビタミン	1.0	1.0	1.0
重酒石酸コリン	0.15	0.15	0.15
コレステロール	0.5	0.5	0.5
コール酸ナトリウム	0.25	0.25	0.25
濾紙粉末	10.0	7.46	8.73
蔗糖	50.80	50.12	50.46
酵母菌体	0.0	10.0	5.0

試験方法 コレステロール低下作用

① 試験飼料

実施例 1 (ロ) で調製したものをを用いた。

② 動物及び飼育方法

a) 10%酵母含有飼料投与群

5週齢の Wistar 系雄ラット (日本クレア製) を、オリエンタル酵母製 F-2 粉末飼料で 7 日間予備飼育した後、1 群 8 匹ずつ群分けし、表 8 の 10%酵母含有飼料を 7 日間投与した。ラットは金属製ケージで群飼いし、飼料及び水は自由に摂取させた。

b) 5%酵母含有飼料投与群

5週齢の Wistar 系雄ラット (日本クレア製) を、オリエンタル酵母製 F-2

粉末飼料で7日間予備飼育した後、1群8匹ずつ群分けし、表8の5%酵母含有飼料を14日間投与した。ラットは金属製ケージで個別飼いし、飼料投与量は1日15gの制限食とし、水は自由に摂取させた。

③ 血漿脂質の測定

a) 10%酵母含有飼料投与群

投与開始から7日目にネンブタール麻酔下（非絶食）で腹部大動脈よりカニューレ採血し、血漿コレステロール濃度及び血漿HDL濃度を測定した。総コレステロール濃度は日立7170型生化学自動分析機を使用して測定した。

HDLコレステロール濃度は協和メディックス製デタミナHDLを使用してHDL成分以外のリポ蛋白成分を沈降させた後、日立7170型生化学自動分析機を使用して測定した。

b) 5%酵母含有飼料投与群

投与開始から7日目に尾静脈から採血し、血漿コレステロール濃度及び血漿HDL濃度を測定した。総コレステロール濃度は日立7170型生化学自動分析機を使用して測定した。

HDLコレステロール濃度は協和メディックス製デタミナHDLを使用してHDL成分以外のリポ蛋白成分を沈降させた後、日立7170型生化学自動分析機を使用して測定した。

④ 肝臓脂質の測定

生理食塩水で肝臓を灌流した後、採取した肝臓を凍結乾燥した。脂質の抽出はFolchらの方法に従い、クロロホルム：メタノール（2：1）で行った。その後、クロロホルム下層を濃縮乾固し、エタノールで再度希釈して各種肝臓脂質成分の測定に供した。肝臓脂質のうちコレステロール量はデタミナTC555を用いて測定した。

【0039】

動物試験成績の評価法

① 統計手法

各動物試験の結果は、Bartlett 法によ分散の均一性を検定した後、等分散の場合は、一次元配置の分散分析を経て Dunnett 型の多重比較検定を、不等分散の場合（Bartlett 法により有意水準 5 % で検定を行い、有意差が得られた検定対象）は Kruskal-Wallis の検定を経て Dunnett 型の多重比較検定を行った。Dunnett 型の多重比較検定では有意水準を 5 % 及び 1 % に設定し、各水準で検定を行った。

② 各脂質成分の低下率の求め方

<血漿中のコレステロール低下率>

血漿コレステロール低下率 100 % とは、コレステロールを含まない餌を投与した普通食群のラットの血漿コレステロール値と同じレベルまで血漿コレステロール値が低下したことを示す。また、血漿コレステロール低下率 0 % とは、コレステロール添加食を投与した対照群のラットの血漿コレステロール値と同じレベルまで血漿コレステロール値が上昇したことを示す。

③ 動脈硬化指数 (Atherosclerotic Index)

動脈硬化指数 (AI) は、

$$AI = (\text{VLDLコレステロール値} + \text{LDLコレステロール値}) / \text{HDLコレステロール値}$$

で表されるが、血漿脂質の値から具体的に計算する場合には、血漿総コレステロール値と血漿HDLコレステロール値を用いて、次式から求めた。

$$AI = (\text{血漿総コレステロール値} - \text{血漿HDLコレステロール値}) / \text{血漿HDLコレステロール値}$$

動脈硬化指数の改善率は、各酵母含有飼料投与群の AI 値とコレステロール添加食投与群（対照群）及び普通食群の AI 値とから算出した。ここで動脈硬化指数改善率 100 % とは、コレステロール非添加食群の AI 値と同じ値であることを示す。また、動脈硬化指数改善率 0 % とは、コレステロール添加食群（対照群）と同じ AI 値であることを示す。

④ 体重測定

ラットの体重は入荷時に測定し、各群間で有意な体重差が出ないように群分けして、予備飼育を開始した。また、本試験開始時と試験終了時に体重測定を行った。

上記の試験方法は、以下の予備試験や実施例に使用する。

予備試験：

採血はコレステロール添加食の投与開始後、0日目、5日目及び8日目に尾静脈から、また、14日目にはネンブター麻酔下に腹部大動脈から行った。採取した血液から血漿を分離した後、各脂質成分を酵素法で測定した。

その結果、図1に示すように、コレステロール投与群の血漿コレステロール値は5日目には最大値近くまで上昇した。その後、14日目まで若干の上昇が認められたものの、ほとんど大きな変化は認められなかった。一方、コレステロール非添加食（コレステロール添加食からコレステロールとコール酸ナトリウムを除いたもの）投与群の血漿コレステロール値は試験期間中も上昇せず、やや漸減する傾向が認められた。

表9に、コレステロール添加食投与開始後14日目の血漿脂質の値を示した。コレステロール非添加食群のコレステロール値が72.5 mg/dLであるのに対して添加食群のそれは325.3 mg/dLであり、約4.5倍上昇しているのがわかる。それに反して、血漿HLDコレステロール値はそれぞれ45.9 mg/dLに対して31.4 mg/dLと有意に低下している。

表 9

血漿脂質濃度 (14 日目)

飼料投与群	コレステロール (mg/dL)	HDL コレステロール (mg/dL)
コレステロール非添加食 (対照群)	72.5 ± 6.1	45.9 ± 4.2
コレステロール添加食 (高脂肪食群)	325.3 ± 48.6**	31.4 ± 4.00**

**p<0.01

表 10 に、コレステロール添加食投与開始後 14 日目の肝臓中の脂質含量を示した。コレステロール添加食群のコレステロール値は非添加食群のそれに比べて約 20 倍高い値を示している。

表 10

肝臓中の脂質含量 (14 日目)

飼料投与群	総コレステロール (mg/肝臓)
コレステロール非添加食 (対照群)	32.9 ± 8.4
コレステロール添加食 (高脂肪食群)	637.9 ± 60.70**

**p<0.01

実施例 2

実施例 1 に示す方法でジャー培養を行い、各 200 g の凍結乾燥菌体 (110℃にて 10 分加熱処理したもの) を調製した。これをコレステロール添加食にそれぞれ 10% 混餌 (表 8 の 10% 酵母群) して、1 群 8 匹の群飼いで、7 日間、自由に摂餌させた。

表 11～表 13 に高コレステロール食を投与した対照群の血漿コレステロール値に比較したときのコレステロール低下率及び動脈硬化指数の改善率 (%) を示した。なお、いずれの群も体重に有意な変化は認められなかった。

表11
血漿コレステロール低下率及び動脈硬化指数改善率

血漿コレステロール低下率及び動脈硬化指数改善率					
YIT番号	酵母分類学上の属・種	血漿脂質			平均体重 (g)
		コレステロール低下率 (%)	ダネット検定 (p<)	動脈硬化指数改善率 (%)	
8164	ハンセニアスポラ ウヴァラム	76.5	0.01	78.0	224.0
8301	ピチア ギルモンディー	74.7	0.01	60.1	216.4
8263	クルイペロマイセス ラクチス	72.8	0.01	68.8	220.4
8292	クルイペロマイセス マルキシアナス	65.5	0.01	55.8	219.6
8266	イサチエンキア オリエンタリス	64.2	0.01	55.3	225.0
8299	ヒポピチア ブルトニ	62.7	0.01	54.0	219.0
8058	ピチア ファリノサ	60.3	0.05	51.8	212.1
8237	キャンジダ ケフィア	60.0	0.01	59.3	216.4
8165	クロエツケラ アフリカーナ	54.9	n. s.	54.1	216.8
8313	トルーラスポラ デルブルエツキー	52.7	0.01	51.0	221.4
8114	トルーラスポラ デルブルエツキー	52.5	0.05	46.2	217.4
8298	ピチア アノマラ	50.7	0.05	38.0	223.2
8280	キャンジダ グラブラータ	48.1	0.05	42.9	215.0
8104	クルイペロマイセス マルキシアナス	48.0	0.05	44.9	221.0
8278	キャンジダ エチエルシー	46.1	0.01	41.5	224.2
8026	デバリオマイセス ハンセニー	44.5	0.05	30.8	217.0
8018	キャンジダ ゼイランドイデス	43.5	0.05	48.4	218.4
8007	キャンジダ クルゼイ	38.3	0.05	43.8	225.6
8223	キャンジダ グロペンギエツセリー	38.1	n. s.	37.2	220.0

表12
血漿コレステロール低下率及び動脈硬化指数改善率

YIT番号	酵母分類学上の属・種	血漿脂質			平均体重 (g)
		コレステロール低下率 (%)	ダネット検定 (p<)	動脈硬化指数改善率 (%)	
8247	ピチア カプスラータ	38.1	n. s.	22.6	220.5
8294	クリイバロマイセス サーモトランス	37.7	n. s.	63.4	220.4
8159	キャンジダ マゴリエー	37.1	n. s.	51.8	220.6
8281	キャンジダ グロベンギエッセリー	36.5	0.05	34.6	221.0
8006	キャンジダ パラプシロシス	36.4	n. s.	33.8	218.0
8311	ヤロウイア リポリチカ	35.8	n. s.	24.5	208.2
8110	トルーラフポローラ デルブルエッキー	34.5	n. s.	23.5	217.0
8133	トルーラフポローラ デルブルエッキー	33.7	n. s.	32.3	209.8
8300	ピチア エチエルシー	33.3	n. s.	52.0	223.2
8302	ピチア スンブラサエフアジエンス	31.5	n. s.	46.6	220.4
8241	キャンジダ バリータ	30.4	n. s.	34.0	223.2
8303	ピチア サブペリキユローサ	27.7	n. s.	48.2	221.4
8285	キャンジダ スデラータ	26.8	n. s.	21.3	219.0
8277	キャンジダ ダイバーサ	26.0	n. s.	28.6	226.4
8291	イサキャンキア テリコラ	25.2	n. s.	30.1	212.2
8107	トルーラフポローラ デルブルエッキー	24.8	n. s.	20.2	207.8
8034	ウィロプシス カリフォルニカ	23.2	n. s.	10.2	214.8
8023	キャンジダ ソラニ	22.9	n. s.	25.0	226.6
8288	キャンジダ ビニー	21.8	n. s.	20.7	223.8
8033	ピチア アノマラ	20.4	n. s.	23.0	220.6

表13
血漿コレステロール低下率及び動脈硬化指数改善率

YIT番号	酵母分類学上の属・種	血漿脂質			平均体重 (g)
		コレステロール低下率 (%)	ダネット検定 (p<)	動脈硬化指数改善率 (%)	
8012	ヤロウィア リポリチカ	13.3	n. s.	22.4	216.6
8181	ロードトルーラ ミヌータ	12.2	n. s.	-15.4	224.0
8304	ロードトルーラ グルチニス	1.0	n. s.	-13.4	221.0
8312	サッカロミコブシス マランガ	-2.1	n. s.	-11.1	215.6
8120	バキチコスボラ トランスパレーンシス	-9.7	n. s.	-24.3	207.8
8317	チゴサッカロマイセス ロキシシー	-10.2	n. s.	0.6	216.8
8129	チゴサッカロマイセス ロキシシー	-34.2	n. s.	-55.9	199.2
8315	チゴサッカロマイセス バイリー	-67.5	n. s.	-77.9	209.0

実施例 3 : 10%酵母添加食投与試験

試験方法 ;

実施例 1 (イ) に示す方法でジャー培養を行い、各 200 g の凍結乾燥菌体を調製した。この調製した凍結乾燥菌体をコレステロール添加食にそれぞれ 10% 混餌 (表 8 の 10% 酵母群) して、1 群 8 匹の群飼いで、7 日間、自由に摂取させた。表 14 に血漿脂質の測定結果を示す。

表14
血漿脂質 (10%混餌投与)

菌株	総コレステロール (mg/dl)	LDLコレステロール (mg/dl)	コレステロール 低下率 (%)	動脈硬化指数 (...)	動脈硬化指数 改善率 (%)
対照群 (高脂肪食群) クルイペロマイセス マルキシアナス YIT8292 イサチェンキア オリエンタリス YIT8266	226.0 ± 14.9 134.5 ± 29.7** 136.2 ± 18.7**	21.7 ± 3.4 23.2 ± 3.9 23.4 ± 3.0	— 65.5 64.2	9.62 ± 1.75 4.84 ± 1.22** 4.88 ± 0.99**	— 55.8 55.3
対照群 (高脂肪食群) クルイペロマイセス ラクチス YIT8263	244.5 ± 50.3 126.8 ± 26.4**	23.7 ± 3.4 27.2 ± 1.8	— 72.8	9.43 ± 2.33 3.67 ± 1.06**	— 68.8
対照群 (高脂肪食群) ハンセニアスボラ ウヴァラム YIT8164 キャンジダ ケフィア YIT8237	230.1 ± 26.9 127.5 ± 19.4** 133.8 ± 19.4**	25.9 ± 3.5 35.9 ± 4.6** 27.8 ± 2.4	— 76.5 60.0	7.97 ± 1.17 2.58 ± 0.54** 3.87 ± 1.06**	— 78.0 59.3
対照群 (高脂肪食群) トルラスボラ デルブルエルッキー YIT8114 ピチア フアリノサ YIT8054 クロエツケラ アフリカーナ YIT8165	222.0 ± 14.9 148.1 ± 19.9** 140.6 ± 18.7** 143.7 ± 37.5**	23.5 ± 6.1 23.7 ± 1.9 24.8 ± 4.8 25.4 ± 1.9	— 52.5 60.3 54.9	8.94 ± 3.10 5.30 ± 1.05** 4.86 ± 2.07** 4.68 ± 1.26**	— 46.2 51.8 54.1

**p<0.01

コレステロールを添加した高脂肪食を与えることにより、対照群では総コレステロール値が増加し、動脈硬化指数は7.97～9.62まで上昇したが、同じ高脂肪食でも本願発明にかかる酵母菌体を10%添加した試験群では、上記分析項目のすべてにおいて数値の上昇が顕著に抑制されているのがわかる。このように、クルイベロマイセス マルキシアナス YIT8292、クルイベロマイセス ラクチス YIT8263、ハンセニアアスポラ ウヴァラム YIT8164、イサチェンキア オリエンタリス YIT8266、キャンジダ ケフィア YIT8237、ピチア ファリノサ YIT8058はいずれも極めて高い血漿コレステロール低下率を示し、動脈硬化指数を改善した。

実施例4：5%酵母添加食投与試験

5週齢の雄ウイスターラットを用いて実施例3と同様の試験を行った。ただし、試験群の飼料に添加する酵母凍結乾燥菌体をそれぞれ5%混餌（表8の5%酵母群）して、1群8匹の個別飼いで、14日間、1日15gの制限食を与えた。

血漿脂質の分析結果は表15に示す通りであって、高脂肪食を与えることにより対照群では総コレステロール値、動脈硬化指数が上昇したが、同じ高脂肪食でも5%の酵母菌体を添加した試験群では上記分析項目のすべてにおいて上昇が顕著に抑制された。

表15
血脂質

菌 株	総コレステロール (mg/dl)	LDLコレステロール (mg/dl)	コレステロール 低下率 (%)	動脈硬化指数 ()	動脈硬化指数 改善率 (%)
対照群 (高脂肪食群) クルイペロマイセス マルキシアナス YIT8292	339.7 ± 34.8 205.3 ± 30.1 ^{**}	23.2 ± 3.8 23.6 ± 5.2	— 57.6	13.85 ± 1.91 7.87 ± 1.18 ^{**}	— 46.8
対照群 (高脂肪食群) クルイペロマイセス ラクサス YIT8263 キャンジダ ケフィア YIT8237 クロエッケラ アフリカーナ YIT8165	377.8 ± 75.3 222.5 ± 27.2 ^{**} 228.9 ± 69.1 ^{**} 276.9 ± 54.6 ^{**}	21.9 ± 1.9 23.9 ± 4.4 25.4 ± 5.0 25.9 ± 5.2	— 55.3 53.0 36.1	16.33 ± 3.83 8.59 ± 2.01 ^{**} 7.98 ± 1.74 ^{**} 9.89 ± 2.30 ^{**}	— 50.7 51.7 42.1
対照群 (高脂肪食群) ハンセニアスボラ ウヴァラム YIT8164 イサチエンギア オリエンタリス YIT8266 ピチア ファリノサ YIT8058	360.0 ± 44.7 237.8 ± 34.8 ^{**} 241.5 ± 49.6 ^{**} 243.3 ± 38.5 ^{**}	21.5 ± 5.2 24.2 ± 2.8 20.9 ± 2.8 24.5 ± 3.1	— 46.5 45.1 44.3	18.37 ± 6.81 8.45 ± 2.45 ^{**} 9.95 ± 1.56 ^{**} 8.86 ± 2.09 ^{**}	— 57.3 48.7 55.0
対照群 (高脂肪食群) トルラスボラ デルブルエルキニー YIT8114	284.2 ± 54.1 199.2 ± 37.3 ^{**}	19.9 ± 4.5 21.9 ± 5.3	— 45.4	13.66 ± 3.31 8.63 ± 3.41 ^{**}	— 40.0

^{**} p<0.01

表 1 6 に肝臓脂質の測定結果を示した。肝臓総コレステロール量は対照群に比べていずれの試験群も有意に低下した。このように、本願発明にかかる酵母は、その経口投与によって血漿脂質の低下作用だけでなく、肝臓脂質の低下作用も示す優れた抗コレステロール素材であることが分かる。

表 1 6

菌 株	総コレステロール (mg/肝臓)
対照群 (高脂肪食群)	538.9±53.5
クルイヘロマイセス マルキシアナス YIT8292	459.6±44.9**
対照群 (高脂肪食群)	469.1±54.3
クルイヘロマイセス ラクチス YIT8263	370.2±51.1**
キャンジダ ケフィア YIT8237	368.5±67.1**
クロエッケラ アフリカーナ YIT8165	399.5±43.3**
対照群 (高脂肪食群)	422.2±57.2
ハンセニアスポラ ウヴァラム YIT8164	390.8±49.1**
イサチェンキア オリエンタリス YIT8266	348.5±36.9**
ピチア ファリノサ YIT8058	331.9±40.2**
対照群 (高脂肪食投与群)	463.1±66.9
トラスボラ デルブルエッキー YIT8114	380.1±65.4**

**p<0.01

実施例 5 胆汁酸吸着能

試験方法：

コール酸 (CA)、タウロコール酸 (TCA)、グリココール酸 (GCA)、ケイデオキシコール酸 (CDCA)、又はデオキシコール酸 (DCA) のナトリウム塩 (シグマ社製) を、最終濃度が 1mM となるように pH 6.7 の 0.1M リン酸緩衝液あるいは pH 7.5 の 0.1M リン酸緩衝液に溶かした。

イサチェンキア オリエンタリス YIT8266 の凍結乾燥菌体、100mg を 1.5mL の遠心チューブに取り、そこに、上で作製した胆汁酸溶液、3.5mL を加えて、37℃で振盪 (120spm) した。1時間後に、酵母菌体を遠心分離 (12,000rpm、10分間) によって沈殿させて、上清を分取した。この上清中の胆汁酸を、エンザバイル II (第一化学薬品社製) で定量し、下式から、胆汁酸吸着率を求めた。胆汁酸吸着率とは、添加した全胆汁酸に対する酵母に吸

着した胆汁酸の割合（％）であり、酵母と胆汁酸の吸着の強さを示す。

$$\text{胆汁酸吸着率（％）} = \left[\frac{\{\text{添加した胆汁酸（nmol）} - \text{上清中の胆汁酸（nmol）}\}}{\text{添加した胆汁酸（nmol）}} \right] \times 100$$

表 1 7 に胆汁酸吸着率を示す。イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 は、コール酸、タウロコール酸、グリココール酸及びケノデオキシコール酸を吸着し、優れた 1 次胆汁酸吸着能を示した。また、酵母とコール酸の吸着率は、pH 6. 7 と pH 7. 2 の反応液においてほぼ同等の値であった。これらの結果から、酵母は大腸管腔内において 1 次胆汁酸と強固に結合し、腸内細菌による脱抱合や 7 α -脱水酸化反応を妨害することによって 2 次胆汁酸の産生を阻害し得ることが示された。

また、2 次胆汁酸であるデオキシコール酸とも強固に結合した。このことから、酵母は、2 次胆汁酸の産生を抑制すると同時に、生じた 2 次胆汁酸を吸着、非動化することによって、その毒性を軽減させる作用も有する。

表 1 7

イサチェンキア オリエンタリスの胆汁酸吸着率（％）

酵母	CA	CA	TCA	GCA	CDCA	DCA
	pH6. 7	pH7. 5	pH7. 5	pH7. 5	pH7. 5	pH7. 5
イサチェンキア オリエンタリス YIT8266	40.3	40.2	29.3	43.8	68.8	73.7

実施例 6

実施例 5 と同方法で種々の酵母の胆汁酸吸着率を測定した結果を表 1 8 に示す。いずれの酵母も胆汁酸、1 次胆汁酸のケノデオキシコール酸及び 2 次胆汁酸のデオキシコール酸の良い吸着性を示した。

表 18

各種酵母の胆汁酸吸着率

菌株名	Y I T No.	胆汁酸吸着率 (%)	
		CDCA (pH7.5)	DCA (pH7.5)
クルイヘロマイセス マルキシアナス	8292	63.0	60.0
クルイヘロマイセス ラクチス	8263	54.4	41.0
クルイヘロマイセス サーモトレランス	8294	79.5	53.6
ハンセニアスポラ ウヴァラム	8164	68.0	40.3
サッカロミセス セレピンエ	8116	66.6	54.5
サッカロミセス タイレンシス	8191	50.8	44.7
サッカロミセス エキシグース	8109	55.5	50.4
サッカロミセス ユニスボラス	8226	58.8	65.5
サッカロミセス ハヤナス	8128	61.8	64.3
ヒボピチア プルトニ	8299	51.6	35.3
キャンジタ ケフィア	8237	56.2	55.3
キャンジタ エチエルシー	8278	55.8	45.1
キャンジタ ゼイラノイデス	8018	76.1	56.0
キャンジタ ソラニ	8023	52.0	36.9
キャンジタ マルトーサ	8283	58.3	46.4
キャンジタ トロピカリス	8286	58.3	40.1
キャンジタ シリンドラシエ	8276	58.8	53.0
キャンジタ ユチリス	8204	51.6	42.2
トルラスボラ デルブルエッキー	8313	58.6	52.6
トルラスボラ デルブルエッキー	8133	64.6	49.4
ピチア アノマラ	8297	56.4	43.4
ピチア アノマラ	8298	51.6	60.9
ピチア ホルスチー	8038	58.8	54.6
チゴサッカロマイセス ロキシー	8129	48.0	39.8
セルロース (比較例)	—	4.1	3.7

実施例7 イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の凍結乾燥菌体による2次胆汁酸産生抑制

予備試験

5週齢の Wistar 系雄ラット（日本クレア製）を、オリエンタル酵母社製 F-2 粉末飼料で7日間飼育した後、1群8匹ずつ各群間で体重差が出ないよう群分けし、表19の試験飼料を14日間投与した。ラットは金属製ケージで個別飼いし、飼料及び水は自由に摂取させた。

表 1 9

飼料組成 [%]

成 分	普通食	高胆汁酸食
カゼイン	22.30	22.30
ショ糖	56.55	55.80
無機塩	4.00	4.00
ビタミン	1.00	1.00
大豆油	1.00	1.00
ラード	10.00	10.00
重酒石酸コリン	0.15	0.15
コレステロール	0.00	0.50
コール酸ナトリウム	0.00	0.25
濾紙粉末	5.00	5.00

1 4 日間飼育後の普通食群、高胆汁酸食群の間では、摂取量及び体重増加量には有意な差は認められなかった。

【0038】

胆汁酸量

25 mg の 1 2 ～ 1 4 日目の凍結乾燥糞便をスクリーキャップ付試験管（15 mL）に量り取り、0.15 μ mol の内部標準物質（5- β -プレグナン-3 α , 17 α , 20 α -トリオール）と5 mL のエタノールを加えて、70℃のブロックヒーターで2時間加熱した。不溶物を遠心分離（3000 rpm、15分間）によって沈殿させた。上清は別の試験管に移して、窒素ガス送風下で乾固した。抽出物を0.5 mL のメタノールに溶かした後、0.45 μ mのフィルター（日本ミリポア社製）を通して不溶物を除いた。10 μ LのサンプルをHPLCシステム（ジャスコ社製）で以下の条件下で分離した。

表 2 0

胆汁酸の分離条件

A液:	アセトニトリル／メタノール／3.0mM酢酸アンモニウム (30:30:40) 混液
B液:	アセトニトリル／メタノール／3.0mM酢酸アンモニウム (20:20:60) 混液
溶出条件:	100% B液、0% A液から、直線的にグラジエントを かけて32分後に、0% B液、100% A液とした。 その後、この組成で13分間溶出した。
流速:	1.0 mL/分
カラム温度:	25℃

ジャスコ社製分離カラム Bilepak-II (4.6mm i.d. × 250mm)

分離カラムを通過した溶出液に、反応液 (0.3mM β -ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド (β -NAD⁺)、1mM エチレンジアミン四酢酸及び0.05% 2-メルカプトエタノールを含む10mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.8) を1.0 mL/分の流速で混合した。この混液を、3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを充填した酵素カラム、Enzymepak (4.6mm i.d. × 35mm、ジャスコ社製) に送り、胆汁酸の脱水酸化反応に伴って生じる NADH (β -NAD⁺の還元型) を蛍光検出器でモニターした (励起波長 345nm、発光波長 470nm)。

各胆汁酸は、標準品の保持時間から同定した。また、胆汁酸の濃度は、各ピークの面積から求めた。この際、内部標準物質のピーク面積から回収率を補正した。

測定結果を表 2 1 に示すが、コール酸を投与することによって、大腸へ到達する1次胆汁酸の量が増大し、2次胆汁酸の産生量が亢進することが明らかとなり、2次胆汁酸産生抑制剤の効果を感度良く評価できることが判明した。

表 2 1

各種胆汁酸の糞便排泄量 [$\mu\text{mol/day}$]

	普通食	高胆汁酸食
<u>1 次胆汁酸</u>		
α -ミューリコール酸	1.52 ± 0.35	$8.52 \pm 3.05^{**}$
β -ミューリコール酸	0.20 ± 0.09	$8.48 \pm 1.55^{**}$
ヒオコール酸	0.00 ± 0.00	$0.23 \pm 0.21^*$
コール酸	0.00 ± 0.00	$29.20 \pm 7.44^{**}$
ケノデオキシコール酸	0.00 ± 0.00	$0.57 \pm 0.20^{**}$
全 1 次胆汁酸	1.72 ± 0.40	$47.00 \pm 10.31^{**}$
<u>2 次胆汁酸</u>		
デオキシコール酸	0.72 ± 0.26	$9.13 \pm 5.92^{**}$
リトコール酸	0.18 ± 0.10	$0.13 \pm 0.18^{n.s.}$
ヒオデオキシコール酸	0.01 ± 0.03	$1.06 \pm 0.54^*$
全 2 次胆汁酸	0.90 ± 0.35	$10.32 \pm 5.84^{**}$

(注) スチューデント t-検定

** 有意水準 5 %

* 有意水準 1 %

n. s. 有意な差なし

イサチエンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の凍結乾燥菌体による 2 次胆汁酸産生抑制

イサチエンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の凍結乾燥菌体を高胆汁酸食に添加して 14 日間投与 (5 % 混餌投与) した (表 2 2)。尚、この際、エネルギー価が同等となるように、カゼイン、蔗糖、脂質及びセルロース量で調整した。酵母菌体の投与は、試験期間中の体重増加量及び摂餌量にほとんど影響を与えなかった (表 2 3)。

表 2 2

飼料組成 [%]

成 分	高胆汁酸食	酵母添加高胆汁酸食
カゼイン	22.30	20.56
ショ糖	55.80	54.15
無機塩	4.00	4.00
ビタミン	1.00	1.00
大豆油	1.00	1.00
ラード	10.00	9.85
重酒石酸コリン	0.15	0.15
コレステロール	0.50	0.50
コール酸ナトリウム	0.25	0.25
濾紙粉末	5.00	3.55
酵母加熱乾燥菌体 [※]	0.00	5.00

※ イサチェンキア オリエンタリスYIT8266

表 2 3

試験期間中の摂食量及び体重増加量

	高胆汁酸食	酵母添加高胆汁酸食
摂餌量[g/14day]	236.0 ± 8.6	227.8 ± 21.5 ^{n.s.}
体重増加[g/14day]	95.9 ± 4.0	93.6 ± 11.9 ^{n.s.}

(注) スチューデント t - 検定

n. s. 有意な差なし

表 2 4 及び 2 5 に示すように、イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 を投与することによって、2 次胆汁酸の糞便排泄量は約 8 2 %、また糞中の 2 次胆汁酸濃度は約 8 4 % 低下した。この傾向は、特にデオキシコール酸とリトコール酸で顕著であった。一方、1 次胆汁酸の糞便排泄量及び糞中濃度は、当該菌体の投与によって有意に上昇した。

イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 は、1 次胆汁酸から 2 次胆汁酸への変換を強力に抑制する作用を有していた。

表 2 4

各種胆汁酸の糞便排泄量 [$\mu\text{mol/day}$]

	高胆汁酸食	酵母添加高胆汁酸食
<u>1 次胆汁酸</u>		
α -ミユリコール酸	13.70 ± 3.40	$15.27 \pm 3.12^{\text{n.s.}}$
β -ミユリコール酸	7.32 ± 2.07	$11.60 \pm 2.48^{**}$
ヒオコール酸	0.12 ± 0.17	$0.29 \pm 0.15^{\text{n.s.}}$
コール酸	24.37 ± 5.86	$35.30 \pm 2.55^{**}$
ケノデオキシコール酸	1.10 ± 0.41	$1.34 \pm 0.27^{\text{n.s.}}$
全 1 次胆汁酸	46.60 ± 7.30	$63.80 \pm 6.81^{**}$
<u>2 次胆汁酸</u>		
デオキシコール酸	10.10 ± 6.51	$0.22 \pm 0.46^{**}$
リトコール酸	0.35 ± 0.31	$0.00 \pm 0.00^*$
ヒオデオキシコール酸	0.80 ± 0.32	$1.81 \pm 0.64^{\text{n.s.}}$
全 2 次胆汁酸	11.25 ± 6.59	$2.03 \pm 0.81^{**}$

(注) スチューデント t-検定

** 有意水準 5 %

* 有意水準 1 %

n.s. 有意な差なし

表 2 5

糞便中の胆汁酸の組成 [%]

	高胆汁酸食	酵母添加高胆汁酸食
<u>1 次胆汁酸</u>		
α-ミユリコール酸	23.58±5.32	23.11±3.47 ^{n.s.}
β-ミユリコール酸	12.59±3.07	17.50±2.51 ^{**}
ヒオコール酸	0.19±0.27	0.43±0.22 ^{n.s.}
コール酸	42.47±11.42	53.87±3.01 [†]
ケノデオキシコール酸	1.89±0.65	2.06±0.50 ^{n.s.}
全 1 次胆汁酸	80.72±11.55	96.97±0.98 ^{**}
<u>2 次胆汁酸</u>		
デオキシコール酸	17.30±11.46	0.30±0.67 ^{**}
リトコール酸	0.59±0.53	0.00±0.00 [†]
ヒオデオキシコール酸	1.39±0.59	2.73±0.89 ^{**}
全 2 次胆汁酸	19.28±11.55	3.03±0.98 ^{**}
	高胆汁酸食	酵母添加高胆汁酸食

(注) スチューデントt-検定

** 有意水準 5 %

* 有意水準 1 %

n. s. 有意な差なし

イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の凍結乾燥菌体による盲腸内pH低下

0.5 g の 14 日目の盲腸内容物を 4.5 mL の精製水に懸濁し、0.5 mL の 10 % 過塩素酸水溶液を添加して 4℃で一晩保存した。この懸濁液を遠心分離 (9,000 rpm、10 分) して上清を分取した後、0.45 μm のフィルター (日本ミリポア社製) を通してから、HPLC 分析に供した。

短鎖脂肪酸は、東亜電波工業社製の HPLC システムを用いて以下の条件で解析した。なお、pH 緩衝溶液は、検出器の直前で溶離液に混合した。

表 2 6

短鎖脂肪酸の分析条件

カラム：	昭和電工社製のカラムKC-811 Shodex (2本)
溶出液 (流量)：	7%アセトニトリルを含む15mM過塩素酸溶液(1mL/min)
カラム温度：	42℃
pH調整溶液 (流速)：	7%アセトニトリル、60mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンを含む15mM過塩素酸溶液(1mL/min)
検出器：	電導度検出器 (東亜電波工業社製)
セル温度：	45℃

表 2 7

盲腸内の pH 及び短鎖脂肪酸含量

	高胆汁酸食	酵母添加高胆汁酸食
盲腸内 pH	6.65±0.08	6.46±0.20*
短鎖脂肪酸含量 [mM]		
酢酸	26.6±8.4	37.5±4.0**
プロピオン酸	7.2±2.3	17.5±4.0**
酪酸	2.2±1.4	3.9±0.8*
乳酸	2.5±1.0	2.6±1.2 ^{n.s.}
コハク酸	15.5±7.3	21.8±7.4 ^{n.s.}
ギ酸	1.1±0.6	1.8±1.3 ^{n.s.}
イソ酪酸	0.7±0.6	0.4±0.4 ^{n.s.}
全短鎖脂肪酸	55.9±15.7	85.6±5.2**

(注) スチューデントt-検定

** 有意水準5%

* 有意水準1%

n.s. 有意な差なし

その結果、高胆汁酸食群はpH 6.65、全短鎖脂肪酸量55.9mMであったのに対し、酵母イサチェンキア オリエンタリス YIT 8266 添加高胆汁酸食群は、pH 6.46 (有意水準5%)、全短鎖脂肪酸量は85.6mM (有意水準1%) と盲腸内 pH の低下が見られ、大腸管腔内を酸性化し腸内細菌の7α-脱水酸化酵素の活性を低下させた。

イサチエンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の凍結乾燥菌体によるコレステロール代謝抑制

25 mg の 14 日目の糞便をスクリーキャップ付試験管 (15 mL) に量り取り、0.1 μ mol の内部標準物質 (5 β -コレスタン) と 1 N 水酸化ナトリウムを含む 90 % エタノール溶液、1 mL を加えて、80℃ のブロックヒーターで加熱した。1 時間後に、0.5 mL の蒸留水を加え、中性ステロールを 2.5 mL の石油エーテルで 2 回抽出した。抽出液は、7.5 mL の蒸留水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで脱水し、窒素ガス送風下で乾固した。抽出した中性ステロールは、トリメチルシリル化した後、ガスクロマトグラフィーを用いて表 28 の条件で測定した。

表 28

クロマトグラフィー (GC) 分析条件

GC 装置:	Yokogawa-Hewlett-Packard 製、モデル 5890
カラム:	SPB-1 FS でコートしたキャピラリーガラスカラム (Supelco 製) 0.32 mm i.d. \times 30 m
カラム温度:	250℃、8 分 \rightarrow 270℃、10℃/分 \rightarrow 270℃、15 分
キャリアー (流速):	He (0.8 mL/min)
インジェクター:	Split, T = 230℃
検出器:	FID, T = 280℃
サンプル注入量:	1 μ L
分析時間:	25 分

イサチエンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の投与によって、コレステロールの腸内代謝産物であるコプロスタノールやコプロスタノンの糞便中の濃度が有意に低下した (表 29)。これらのコレステロールの腸内代謝産物については、大腸癌等の疾患の発症に関係していることから (Suzuki, K., et. al., Cancer Lett., 33, 307-316, 1986)、イサチエンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 は、コレステロール代謝産物の産生を抑制し、種々の疾病を予防、治療し得る。

表 2 9

糞便中の中性コレステロールの組成 [%]

	高胆汁酸食	酵母添加高胆汁酸食
コブロステロール	25.7±12.5	9.2±11.9*
コブロスタノン	1.9±2.5	0.4±0.6 ^{n.s.}
コレステロール	72.3±14.2	90.5±12.4*
コブロスタノール+	27.7±14.2	9.5±12.4*
コブロスタノン		

(注) スチューデントt-検定

* 有意水準 1 %

n.s. 有意な差なし

実施例 8 イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の菌体内容物による
2 次胆汁酸産生抑制

菌体内容物の調製

イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の凍結乾燥菌体を 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 8.5) に懸濁して、ダイノミル (シンマルエンタープライゼス社製) を用いて機械的に破碎した。この際、0.45 mm 径のガラスビーズを磨砕剤として使用し、磨砕操作は、顕微鏡観察により 95 % 以上の菌体が破碎されるまで繰り返した。菌体破碎液を 9,000 g で 15 分間遠心分離して、上清中に菌体内容物を分離した。この菌体内容物を採集し、凍結乾燥した。

イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の菌体内容物による 2 次胆汁酸産生抑制

実施例 7 と同方法でイサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 から調製した菌体内容物の 2 次胆汁酸産生抑制効果を検証した。

本試験の飼料組成は、表 3 0 に示した。酵母菌体内容物の投与は、試験期間中の体重増加量や摂取量にほとんど影響を与えなかった。(表 3 1)。

表 3 0

飼料組成（％組成）

成 分	高胆汁酸食	菌体内容物添加高胆汁酸食
カゼイン	22.30	20.78
ショ糖	55.80	53.12
無機塩	4.00	4.00
ビタミン	1.00	1.00
大豆油	1.00	1.00
ラード	10.00	9.77
重酒石酸コリン	0.15	0.15
コレステロール	0.50	0.50
コール酸ナトリウム	0.25	0.25
濾紙粉末	5.00	4.43
酵母菌体内容物	0.00	5.00

表 3 1

試験期間中の摂食量及び体重増加量

	高胆汁酸食	菌体内容物添加高胆汁酸食
摂餌量[g/14day]	232.8±9.9	220.7±6.5 ^{n.s.}
体重増加[g/14day]	95.9±4.0	88.4±4.5 ^{n.s.}

(注) スチューデントt-検定

n.s. 有意な差なし

表 3 2 及び表 3 3 に示すように、イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の菌体内容物を投与することによって、2 次胆汁酸の糞便排泄量は約 7 6 %、また糞中の 2 次胆汁酸濃度は約 7 0 % 低下した。

イサチェンキア オリエンタリス Y I T 8 2 6 6 の菌体内容物は、凍結乾燥菌体と同様に、1 次胆汁酸から 2 次胆汁酸への変換を強力に抑制する作用を有していた。

表 3 2

各種胆汁酸の糞便排泄量 [$\mu\text{mol/day}$]

	高胆汁酸食	菌体内容物添加高胆汁酸食
<u>1 次胆汁酸</u>		
α -ミユリコール酸	8.56 ± 1.85	$6.80 \pm 2.04^{\text{n.s.}}$
β -ミユリコール酸	6.80 ± 2.18	$8.70 \pm 3.04^{\text{n.s.}}$
ヒオコール酸	0.20 ± 0.15	$0.25 \pm 0.06^{\text{n.s.}}$
コール酸	28.96 ± 11.99	$29.99 \pm 4.77^{\text{n.s.}}$
ケノデオキシコール酸	0.44 ± 0.29	$0.64 \pm 0.35^{\text{n.s.}}$
全 1 次胆汁酸	44.96 ± 13.17	$46.37 \pm 9.40^{\text{n.s.}}$
<u>2 次胆汁酸</u>		
デオキシコール酸	9.87 ± 5.46	$2.01 \pm 2.26^{**}$
リトコール酸	0.02 ± 0.05	$0.00 \pm 0.00^{\text{n.s.}}$
ヒオデオキシコール酸	0.65 ± 0.36	$0.49 \pm 0.14^{\text{n.s.}}$
全 2 次胆汁酸	10.54 ± 5.29	$2.51 \pm 2.18^{**}$

(注) スチューデント t-検定

** 有意水準 5 %

n.s. 有意な差なし

表 3 3

糞便中の胆汁酸の組成 [%]

	高胆汁酸食	菌体内容物添加高胆汁酸食
<u>1 次胆汁酸</u>		
α -ミユリコール酸	16.01 ± 4.33	$13.75 \pm 1.82^{\text{n.s.}}$
β -ミユリコール酸	12.39 ± 3.19	$17.30 \pm 3.29^{**}$
ヒオコール酸	0.34 ± 0.20	$0.51 \pm 0.09^{\text{n.s.}}$
コール酸	51.04 ± 10.63	$62.47 \pm 6.95^{**}$
ケノデオキシコール酸	0.76 ± 0.34	$1.27 \pm 0.56^{\text{n.s.}}$
全 1 次胆汁酸	79.82 ± 8.31	$94.02 \pm 3.61^{**}$
<u>2 次胆汁酸</u>		
デオキシコール酸	18.29 ± 8.90	$3.64 \pm 3.76^{**}$
リトコール酸	0.04 ± 0.11	$0.00 \pm 0.00^{\text{n.s.}}$
ヒオデオキシコール酸	1.13 ± 0.38	$1.07 \pm 0.44^{\text{n.s.}}$
全 2 次胆汁酸	20.18 ± 8.31	$5.98 \pm 3.61^{**}$

(注) スチューデント t-検定

** 有意水準 5 %

n.s. 有意な差なし

盲腸内の全短鎖脂肪酸量及びpHは、高胆汁酸食群が54.0mM、pH6.65であったのに対し、酵母菌体内容物添加高胆汁酸食群では、68.3mM（有意水準5%）、pH6.46（有意水準5%）であった。よって、酵母菌体内容物は、短鎖脂肪酸量を増大させることによって大腸管腔内を酸性化し、腸内細菌の7 α -脱水酸化酵素の活性を低下させる作用を有していた。

表34

盲腸内のpH及び短鎖脂肪酸含量

	高胆汁酸食	菌体内容物添加高胆汁酸食
盲腸内pH	6.65 \pm 0.08	6.46 \pm 0.20*
短鎖脂肪酸含量[mM]		
酢酸	26.2 \pm 9.0	30.2 \pm 7.1 ^{n.s.}
プロピオン酸	7.2 \pm 2.5	14.3 \pm 2.2**
酪酸	2.2 \pm 1.5	2.1 \pm 0.9 ^{n.s.}
乳酸	2.4 \pm 1.0	1.9 \pm 1.2 ^{n.s.}
コハク酸	14.3 \pm 7.1	17.8 \pm 6.4 ^{n.s.}
ギ酸	0.9 \pm 0.3	1.8 \pm 1.7 ^{n.s.}
イソ酪酸	0.7 \pm 0.7	0.2 \pm 0.2 ^{n.s.}
全短鎖脂肪酸	54.0 \pm 15.9	68.3 \pm 13.9*

（注）スチューデントt-検定

** 有意水準5%

* 有意水準1%

n.s. 有意な差なし

イサチェンキア オリエンタリスYIT8266の菌体内容物の投与によって、コレステロールの腸内代謝産物であるコプロスタノールやコプロスタノンの糞便中濃度が有意に低下した。このことから、イサチェンキア オリエンタリスYIT8266の菌体内容物は、凍結乾燥菌体と同様、コレステロール代謝産物の産生を抑制することによっても種々の疾病の予防や治癒に寄与し得る。

表 3 5

糞便中の中性ステロールの組成 [%]

	高胆汁酸食	菌体内容物添加高胆汁酸食
コプロスタノール	21.1±8.2	10.0±9.9*
コプロスタノン	2.0±1.6	0.5±0.5**
コレステロール	76.9±9.6	89.6±10.2*
コプロスタノール+コプロスタノン	23.1±9.6	12.1±10.7*

(注) スチューデントt-検定

** 有意水準 5 %

* 有意水準 1 %

実施例 9

上記実施例で使用した各種酵母菌体を用いて、次の組成の飲食品を製造した。

1) 健康向け食品 (錠剤)

次の添加物を含有する組成物を打錠し、錠剤とした。

表 3 6

健康向け食品の組成 [%]

酵母菌体の乾燥物	10
植物抽出末	30
ローヤルゼリー粉末	5
コラーゲン末	5
乳 糖	25
トウモロコシデンプン	20
ヒドロキシプロピルセルロース	4
ステアリン酸マグネシウム	1

2) 健康向け飲料

次の処方により健康飲料を製造した。

表 3 7

健康向け飲料の組成 [%]

酵母菌体の乾燥物	5
ハチミツ	15
クエン酸	0.1
dl-リンゴ酸	0.1
植物抽出末（シナモン）	20
D-ソルビトール液（70%）	10
安息香酸ナトリウム	0.05
香 料	適 量
精製水	100とする残余

3) 果汁飲料

次の処方により果汁飲料を製造した。

表 3 8

果汁飲料の組成 [%]

ブドウ糖液糖	33
グレープフルーツ果汁	60
酵母菌体の乾燥物	5
香 料	適 量
酸味料	適 量

4) 発酵乳

次の処方により加熱酵母菌体入り発酵乳を製造した。

10%の脱脂粉乳と5%のグルコースを滅菌し、ラクトバチルス属細菌を植菌してヨーグルトを製造した。これに実施例1で得た加熱酵母菌体を0.1～20%混合し、発酵乳を製造した。

5) 乳酒

次の処方により乳酸を製造した。

10%の脱脂粉乳と5%のグルコースを滅菌し、ラクトバチルス属細菌を植菌すると同時に実施例1で得た酵母を植菌し、48時間37℃で静置培養して乳酒を製造した。

産業上の利用可能性

上述の酵母の菌体又はその構成物からなる本発明のコレステロール低下剤は顕著な血漿コレステロール低下作用、肝臓コレステロール低下作用を示し、動脈硬化その他コレステロール蓄積が原因の疾患の予防に極めて有効なものである。

また、胆汁酸の吸着及び大腸管腔内の酸性化等を介して、2次胆汁酸の産生を強力に抑制し、本発明の2次胆汁酸産生抑制剤は、大腸癌、肝癌、膵臓癌、胆管癌、胆石症などの予防及び治療に極めて有効なものである。

しかも、本願発明に用いる酵母は古くからチーズや馬乳酒、ワイン製造等に使われていることから明らかなように病原性のない安全な酵母であり、その菌体あるいは構成物からなる本願発明のコレステロール低下剤も、ラットに経口投与した場合8 g/kgの投与量でも死亡例は認められず、長期間投与しても安全性には問題がない。

従って、本発明のコレステロール低下剤及び2次胆汁酸産生抑制剤は経口投与する医薬として利用するほか、食品に混合して日常的に摂取させ、動脈硬化、大腸癌、肝癌、膵臓癌、胆管癌、胆石症などの予防と健康増進に役立たせるのにも適した極めて有効なものである。

請求の範囲

1. キャンジダ属、イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイベロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母の1種又は2種以上を有効成分として含有するコレステロール低下剤。
2. キャンジダ・ケフィア、イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスポラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の1種又は2種以上を有効成分として含有するコレステロール低下剤。
3. 請求項1又は2記載の酵母を含有することを特徴とするコレステロール低下用飲食品。
4. 酵母を有効成分とする2次胆汁酸産生抑制剤。
5. 酵母がイサチェンキア属、クルイベロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒポピチア属、キャンジダ属、トルラスポラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる1種又は2種以上の酵母であることを特徴とする請求項4記載の2次胆汁酸産生抑制剤。
6. 酵母がイサチェンキア・オリエンタリス、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、クルイベロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒポピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスポラ・デルブルエッキー、ピチア・アノマラ、ピチア・ホルスチー、及びチゴサッカロマイセス・ロキシーから

選ばれる1種又は2種以上の酵母であることを特徴とする請求項4記載の2次胆汁酸産生抑制剤。

7. 請求項4～6いずれか1項記載の酵母を含有してなる2次胆汁酸産生抑制用飲食品。

8. キャンジダ属、イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイベロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母の1種又は2種以上のコレステロール低下剤製造のための使用。

9. キャンジダ・ケフィア、イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスポラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の1種又は2種以上のコレステロール低下剤製造のための使用。

10. 請求項1又は2記載の酵母のコレステロール低下用飲食品製造のための使用。

11. 酵母の2次胆汁酸産生抑制剤製造のための使用。

12. 酵母がイサチェンキア属、クルイベロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒポピチア属、キャンジダ属、トルラスポラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる1種又は2種以上の酵母である請求項11記載の使用。

13. 酵母がイサチェンキア・オリエンタリス、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、クルイベロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒポピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスポラ・デルブルエッキー、ピチ

ア・アノマラ、ピチア・ホルスチー、パキチコスボラ・トランスバーレンシス及びチゴサッカロマイセス・ロキシーから選ばれる1種又は2種以上の酵母である請求項11記載の使用。

14. 請求項11～13のいずれか1項記載の酵母の2次胆汁酸産生抑制用飲食品製造のための使用。

15. キャンジダ属、イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイペロマイセス属、ピチア属又はトルラスボラ属に属する酵母の1種又は2種以上を投与することを特徴とするコレステロール低下のための処置方法。

16. キャンジダ・ケフィア、イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイペロマイセス・マルキシアナス、クルイペロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスボラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の1種又は2種以上を投与することを特徴とするコレステロール低下のための処置方法。

17. 酵母を投与することを特徴とする2次胆汁酸産生抑制のための処置方法。

18. 酵母がイサチェンキア属、クルイペロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒポピチア属、キャンジダ属、トルラスボラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる1種又は2種以上の酵母である請求項17記載の方法。

19. 酵母がイサチェンキア・オリエンタリス、クルイペロマイセス・マルキシアナス、クルイペロマイセス・ラクチス、クルイペロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレビスエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒポピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスボラ・デルブルエッキー、ピチ

ア・アノマラ、ピチア・ホルスチー、パキチコスボラ・トランスバーレンシス及び
びチゴサッカロマイセス・ロキシーから選ばれる 1 種又は 2 種以上の酵母である
請求項 17 記載の方法。

補正書の請求の範囲

[2000年12月4日(04.12.00)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲
1、2、8、9、15及び16は補正された；他の請求の範囲は変更なし。(3頁)]

1. (補正後) イサチエンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエツケラ属、クルイベロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母の1種又は2種以上を有効成分として含有するコレステロール低下剤。
2. (補正後) イサチエンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエツケラ・アフリカーナ、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスポラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の1種又は2種以上を有効成分として含有するコレステロール低下剤。
3. 請求項1又は2記載の酵母を含有することを特徴とするコレステロール低下用飲食品。
4. 酵母を有効成分とする2次胆汁酸産生抑制剤。
5. 酵母がイサチエンキア属、クルイベロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒボピチア属、キャンジダ属、トルラスポラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる1種又は2種以上の酵母であることを特徴とする請求項4記載の2次胆汁酸産生抑制剤。
6. 酵母がイサチエンキア・オリエンタリス、クルイベロマイセス・マルキシアナス、クルイベロマイセス・ラクチス、クルイベロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレピシエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒボピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスポラ・デルブルエッキー、ピチア・アノマラ、ピチア・ホルスデー、及びチゴサッカロマイセス・ロキシーから

選ばれる1種又は2種以上の酵母であることを特徴とする請求項4記載の2次胆汁酸産生抑制剤。

7. 請求項4～6いずれか1項記載の酵母を含有してなる2次胆汁酸産生抑制用飲食品。

8. (補正後) イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイペロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母の1種又は2種以上のコレステロール低下剤製造のための使用。

9. (補正後) イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイペロマイセス・マルキシアナス、クルイペロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスポラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の1種又は2種以上のコレステロール低下剤製造のための使用。

10. 請求項1又は2記載の酵母のコレステロール低下用飲食品製造のための使用。

11. 酵母の2次胆汁酸産生抑制剤製造のための使用。

12. 酵母がイサチェンキア属、クルイペロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒポピチア属、キャンジダ属、トルラスポラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる1種又は2種以上の酵母である請求項11記載の使用。

13. 酵母がイサチェンキア・オリエンタリス、クルイペロマイセス・マルキシアナス、クルイペロマイセス・ラクチス、クルイペロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレピシエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスボラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒポピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスポラ・デルブルエッキー、ピチ

ア・アノマラ、ピチア・ホルスチー、パキチコスポラ・トランスバーレンシス及びチゴサッカロマイセス・ロキシーから選ばれる1種又は2種以上の酵母である請求項11記載の使用。

14. 請求項11～13のいずれか1項記載の酵母の2次胆汁酸産生抑制用飲食品製造のための使用。

15. (補正後) イサチェンキア属、ハンセニアスポラ属、クロエッケラ属、クルイペロマイセス属、ピチア属又はトルラスポラ属に属する酵母の1種又は2種以上を投与することを特徴とするコレステロール低下のための処置方法。

16. (補正後) イサチェンキア・オリエンタリス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、クロエッケラ・アフリカーナ、クルイペロマイセス・マルキシアナス、クルイペロマイセス・ラクチス、ピチア・ファリノサ及びトルラスポラ・デルブルエッキーから選ばれる酵母の1種又は2種以上を投与することを特徴とするコレステロール低下のための処置方法。

17. 酵母を投与することを特徴とする2次胆汁酸産生抑制のための処置方法。

18. 酵母がイサチェンキア属、クルイペロマイセス属、ハンセニアスポラ属、サッカロミセス属、ヒポピチア属、キャンジダ属、トルラスポラ属、ピチア属及びチゴサッカロマイセス属から選ばれる1種又は2種以上の酵母である請求項17記載の方法。

19. 酵母がイサチェンキア・オリエンタリス、クルイペロマイセス・マルキシアナス、クルイペロマイセス・ラクチス、クルイペロマイセス・サーモトレランス、ハンセニアスポラ・ウヴァラム、サッカロミセス・セレビスエ、サッカロミセス・ダイレンシス、サッカロミセス・エキシグース、サッカロミセス・ユニスポラス、サッカロミセス・バヤナス、ヒポピチア・ブルトニ、キャンジダ・ケフィア、キャンジダ・エチエルシー、キャンジダ・ゼイラノイデス、キャンジダ・ソラニ、キャンジダ・マルトーサ、キャンジダ・トロピカリス、キャンジダ・シリンドラシエ、キャンジダ・ユチリス、トルラスポラ・デルブルエッキー、ピチ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 3-30667, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 08 February, 1991 (08.02.91), Full text; Claims (Family: none)	1-3, 8-10 4-7, 11-14
X Y	JP, 8-298982, A (Aasu Giken K.K.), 19 November, 1996 (19.11.96), Claim 1; Par. No. [0001] (Family: none)	1, 3, 8, 10 2, 4-7, 9, 11-14
Y	EP, 462021, A (CHIBA FLOUR MILLING CO. LTD.), 18 December, 1991 (18.12.91) & JP, 4-49243, A	1-14
Y	JP, 50-68867, A (Oriental Koubo Kogyo K.K.), 09 June, 1975 (09.06.75) (Family: none)	1-14
Y	Kazutomo IMAHORI et al. ed., "Seikagaku Jiten", Kabushiki Kaisha Tokyo Kagaku Doujin (1 st printing in 1984) p.763, "biosynthesis of bile acid"	1-14
A	US, 4891220, A (Immudyne, Inc.), 02 January, 1990 (02.01.90)	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 October, 2000 (06.10.00)

Date of mailing of the international search report
17 October, 2000 (17.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04843

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15-19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 15 to 19 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K35/72, A61P3/06, A23L1/28, A23L1/30		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN)、MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 3-30667, A (雪印乳業株式会社) 8. 2月. 1991 (08. 02. 91) 全文、特に特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-3, 8-10 4-7, 11-14
X Y	JP, 8-298982, A (株式会社アース技研) 19. 11月. 1996 (19. 11. 96) 【請求項1】、【0001】 (ファミリーなし)	1, 3, 8, 10 2, 4-7, 9, 11-14
Y	EP, 462021, A (CHIBA FLOUR MILLING CO. LTD.) 18. 12月. 1991 (18. 12. 9	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 06. 10. 00		国際調査報告の発送日 17.10.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	1) & JP, 4-49243, A	
Y	JP, 50-68867, A (オリエンタル酵母工業株式会社) 9. 6月. 1975 (09. 06. 75) (ファミリーなし)	1-14
Y	今堀 和友 外 監修「生化学辞典 第1版」(株式会社 東京化学同人発行) (1984年第1刷発行) P. 763「胆汁酸の生合成 (biosynthesis of bile acid)」の項	1-14
A	US, 4891220, A (Immudyne, Inc.) 2. 1 月. 1990 (02. 01. 90)	1-14

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15-19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲15~19は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iV)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



と母核構造であるが、側鎖がステロイドと同等の骨格をもつ中環の β -リボヒドロキシステロイドである。 C_{17} の β -ヒドロキシ骨格をもつものが多く、母核あるいは側鎖に数個の水酸基をもつ、哺乳類より両生類までの低等脊椎動物の胆汁中には、側鎖が酸基のモノ硫酸エステルのかたまりの塩として存在する。ただし、ヒキ、ニールは硫酸エステルとなっており、ヒキの胆汁アルコールは、 C_{24} -胆汁酸合成の中間体として知られる。シムノール (scymnol) は O. Hagimarsen (1898) がサメ胆汁から発見した最初の胆汁アルコールである。生きた化石といわれてシラカブの主胆汁酸はラウロールである。爬虫類以上の高等脊椎動物には胆汁アルコールはみられない。しかし、最近胆臓黄色腫患者胆汁から胆汁アルコールが見いだされた。胆汁酸合成で C_{26} 位ヒドロキシラーゼの欠損により胆汁アルコールが蓄積する先天性代謝異常と考えられている。

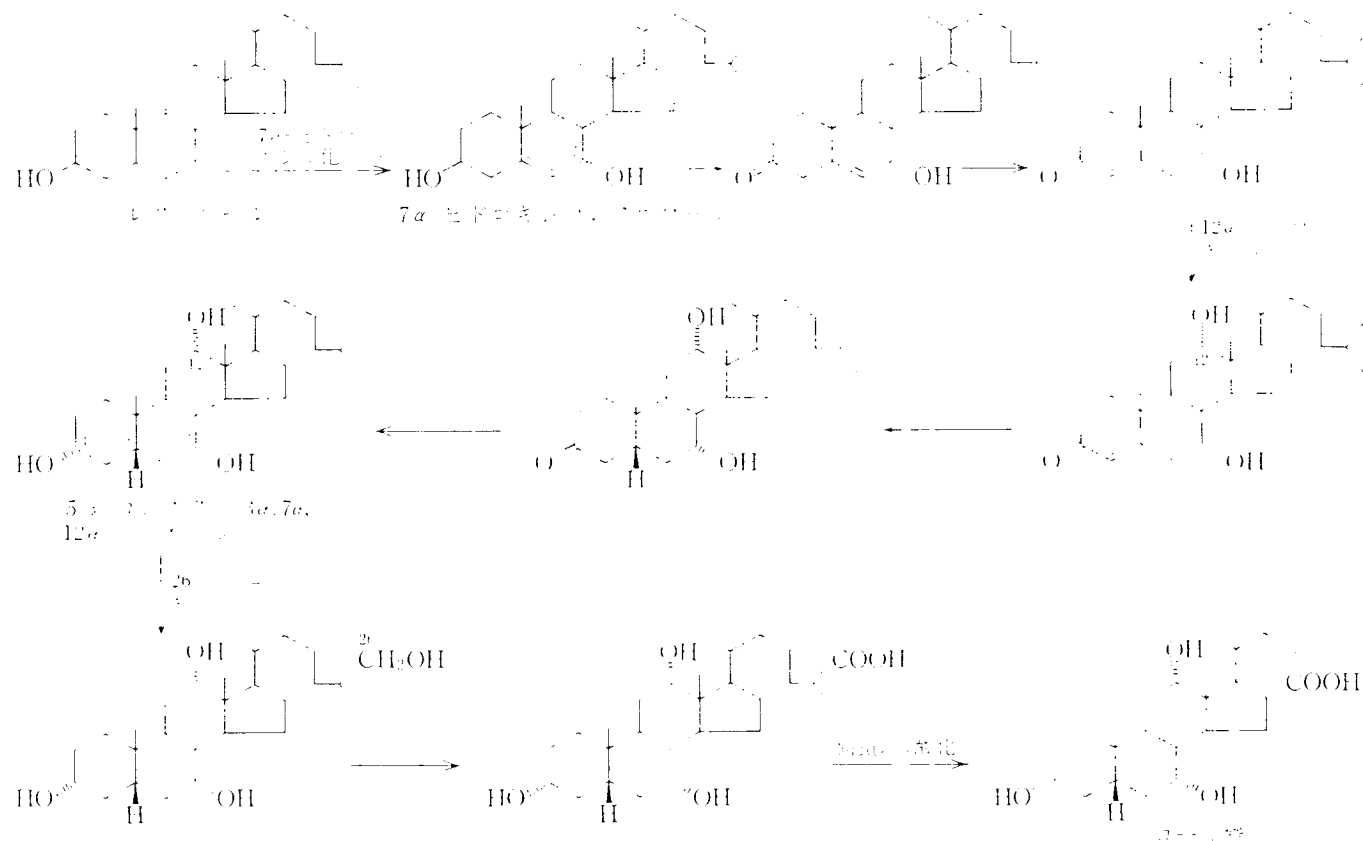
胆汁うっ滞 (cholestasis) 毛細胆管からファーター乳頭までのどこかに異常をきたし、胆汁の排泄が障害された状態。種々の胆汁成分の分泌が障害され、血中・尿中のビリルビン、胆汁酸が増加する。進行すると搔痒(そうよう)を伴う高度の黄疸を呈し、便は灰白色になる。慢性化すると黄色腫、肝変化、脂溶性ビタミン欠乏を生じる。1) 肝内胆汁うっ滞(肝内胆管のどこかに原因があると考えられるもの、病態の多くは原因不明で、主要な病変部位も必ずしも明確でない。急性肝炎・肝硬変症などの胆汁うっ滞型、 C_{17} アル化ステロイド・ケロプロマジンなどの薬剤によるもの、妊娠性慢性胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変症、硬化性胆管炎などがある。2) 肝外胆汁うっ滞。

肝門部の大きな胆管(ファーター乳頭までの胆管)の閉塞によるもの。胆管が、癌腫、結石、炎症、胆管の狭窄、炎症、外傷、胆管よりリンパ管の閉塞などによるもので、多くは外科的処置を要する。

胆汁酸 (bile acid) 哺乳類、鳥類、両生類、魚類の胆汁中に広く見いだされる五環構造の C_{24} ステロイドで、コレステロールから生合成され、脂質の消化・吸収に役める。一般に、胆汁酸はコレステロールに1~3個の水酸基が結合した基本構造をもつ。最も単純なものA、B環が結合して、 C_{13} 位の水酸基は α 位であるが、A、Bトランス配位が α 胆汁酸(allo-bile acid)とも呼ばれて見いだされる。低等脊椎動物には実数24以上の高級胆汁酸が見いだされている。 C_{24} 胆汁酸は、胆汁中で通常ケル、ノタケル、とアミド結合した抱合型として存在し、ナトリウム塩となっている。胆汁酸の種類は動物により異なるが、ヒトなど多くの哺乳動物の肝で生成される一次胆汁酸(primary bile acid)は、コール酸とタウロコール酸である。これらは腸内細菌でそれぞれ二次胆汁酸(secondary bile acid)のデオキシコール酸とリスコール酸に変換される。胆汁酸と胆汁酸塩(bile salt)の名称は厳密には異なる。化の形態により、酸(非イオン化)、塩(イオン化)に区別されるが、一般には両者は同じ意味で用いられることが多い。抱合胆汁酸。

胆汁酸塩 (bile salt) → 胆汁酸

胆汁酸の生合成 (biosynthesis of bile acid) 胆汁酸は肝でコレステロールから生合成される。多くの哺乳動物の肝で生成する一次胆汁酸はコール酸とタウロコール酸である。生合成の異なる経路は



コレステロール生合成の主経路 (→胆汁酸の生合成)



ステロイド骨格の变化後に側鎖が切断されるもので、主鎖はステロイド骨格の7 α と14 α にメチル化で7 α -ヒドロキシステロイド骨格が形成される。すなわち3 β -OHのケトン化、二重結合の移動($\Delta^4 \rightarrow \Delta^5$)、12 α -ヒドロキシ化、 Δ^5 二重結合の和、13 α -メチルの還元(3 α -OH)の各ステップを経て、5 α -コレステロール(3 α ,7 α ,12 α -トリオール)が生成される。つぎに側鎖の26位ヒドロキシ化が起こり、カルコステル酸まで酸化後、側鎖(3 β 酸化)によりカルコステル酸が生成される(前ページ中、12 α -ヒドロキシ化ステップを経ない場合はケロステル酸が生成される。これらの反応系のため胆汁酸の生合成は7 α -ヒドロキシ化ステップは、胆汁酸生合成の律速段階として知られる。この主たる生合成路のほかにも胆汁酸生合成の副経路の存在が知られる。

胆汁色素 [bile pigment, bilirubinoid] 胆汁酸とともに胆汁の主要成分で、乾燥重量が15~20%を占める。肝臓から胆汁中に分泌される。黄疸色のビリルビンと青緑色のビリルグリンが胆汁色素の生成成分で、ヒトや肉食動物ではビリルビンが多く黄褐色~赤褐色である。草食動物や鳥類ではビリルグリンが多い。ビリルグリンは胆汁の透過性の高い開環型のものである。開環型のビリルグリンと比べて天然に胆汁に分泌する、ビリルグリン化合物を含めることもある。胆汁色素は一般に肉食動物ではビリルグリンと他の一部の代謝産物で胆汁中に見いだされるが、水生生物では胆汁以外にも存在する。カサゴの胆嚢の青色色素オキニル、サメの胆の青色色素オキニル、海藻の青色色素オキニル、オキニルなど、昆虫の体液中にみられるオキニルなどによりこれらの色素の起源は明らかでないが、食物中の胆汁色素、ヘモグロビン、クロロフィルなどに由来するともいわれる。ビリルグリンのグルクロニドは腸内細菌の加水分解作用を受けてグルクロン酸基がはずれる。再び遊離型になったビリルビンはそのヒドロキシル基がエチル基に還元されてメチルビリルビンとなる。さらに還元が進むとウロビリノーゲン類となり糞便中に排泄される。ウロビリノーゲンには3種類あり、そのうち1-ウロビリノーゲンは正常糞便中の主成分であり、1-ウロビリノーゲンは微量成分である。抗生物質を投与すると、腸内細菌叢が破壊されてウロビリノーゲンの産生が抑制する結果、ビリルビンはそのまま糞便中に排泄される。オキシサイクリンなどの大量投与後投与を中止すると正常便中にはみられない1-ウロビリノーゲンが1-過性に出現する。これらのウロビリノーゲン類は無色のウロモノーゲンであるが、空気酸化を受けると黄褐色のウロモニン類になる。糞便中の排泄量100~250 mg/日。ウロビリノーゲンの一部は腸管から吸収されて血中に入り、尿中に排泄され日1 mg/日。残りは胆汁中に排泄される。黄変は胆汁に胆汁色素が増加し皮膚が黄色を呈する状態であるが、ヘムの分解がたまたま溶血などの促進された場合や、肝臓の障害によってビリルグリンの抱合が十分に行われない時、またはヘムの分解物の腸管への排泄路が閉鎖された場合などに認められる。

単集落分離 [single colony isolation] 懸液培地上に細菌あるいは酵母の培養液を白金針などを用いて図ば、互いに独立したコロニーを形成させる手法をいう。培養細胞の場合にはシャーレに数個の細胞をまき、

互いに独立したコロニーを形成させる。通常それぞれのコロニーはそれぞれが1個の細胞によって形成されたものであるから、この方法を確立することにより、遺伝的にほとんど均一な細胞のコロニーを得ることができ、

短縮還元的カルボン酸回路 [short reductive carboxylic acid cycle] 還元的カルボン酸回路

単純拡散 [simple diffusion] 生体膜を介する受動輸送の1形式。輸送体を介さない。単純拡散には膜の脂質に溶解して拡散する脂溶性物質と膜の非特異的な小孔(赤血球膜では半径0.3 nm程度と推定されている)を通して拡散する小さな分子の透過が含まれる。水の透過やイオン、尿素あるいは酸素、二酸化炭素などの気体は、膜の小孔を通して透過し自由拡散に近い。また、小腸における脂肪の吸収のように、脂溶性の物質の透過は、油相への分配係数に従う。これらの単純拡散の重要は、膜内外の物質の濃度差および膜面積に比例する。(→促進拡散)

単純脂質 [simple lipid] 脂質は単純脂質と複合脂質に2つ別される。単純脂質はC,H,Oより構成され、一般にアセトンに可溶性である。構造的には脂肪酸と各種のアミノアルコールのエステルであり、アルコールがグリセロールの場合、グリセリルアルコール(中性脂肪)としてモノ、ジ、トリ、テトラグリセロールがある。さらにさらに、コレステロールエステル、セタノールAおよびDのエステルなどが単純脂質に属する。グリセリルアルコールの変型としてエーテル脂質も単純脂質に属する。

単純性疱疹ウイルス [simple herpesvirus]

単純タンパク質 [simple protein] 完全加水分解によりアミノ酸のみを生じるタンパク質。複合タンパク質と対比される。単純タンパク質は、通常、溶解性に基づき、アルブミン、グロブリン、グルテリン、カゼイン、セBUMIN、プロテリン、硬タンパク質に分類される。

単純ハフテン [simple hapten] ハフテン基(hapten)とは抗原に用いられる。多糖体抗原などを加水分解して得られる小分子成分は、抗体との沈降反応、凝集反応などを示さなくなる。これらの反応を阻害する能力をもつことから、抗体との結合能を保持していることを確かめることができる。これらの物質は1個の抗原決定基をもち、単純ハフテンという。(→抗原決定基)

単純ヘルペスウイルス [herpes simplex virus]

単にヘルペスウイルス、単純性疱疹ウイルス、熱性疱疹ウイルス、また herpesvirus hominis などともよばれる。HSVと略される。分類学上はヘルペス(アルファ)ヘルペスウイルス(human (alpha) herpesvirus)が正式名。ヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス属の1種。1型と2型がある。成人に広く蔓延し、主として1型は口唇・角膜など、2型は陰部に感染する。一生持続する潜伏感染を起こし、三叉神経・脊髄後根神経節などに潜伏する。2型は子宫颈がんとの関係も疑われている。核で複製する。直径150~185 nmの核膜由来のエンベロープをもち、その内部に直径85~110 nmの直20面体のキャプシドがある。感染性ウイルス粒子の浮遊密度は2相を示す(→ヘルペスウイルス)。ゲノムは分子量 100×10^6 と大きな線状二重

